



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CENTRO DE POSTGRADO

Maestría en
“REPRODUCCIÓN ANIMAL”

**“EFECTO DEL DODECIL SULFATO IONICO ADICIONADO A UN
DILUYENTE LIBRE DE YEMA DE HUEVO SOBRE LA CALIDAD DEL
SEMEN OVINO CONGELADO”**

**Tesis previa a la obtención del
título de MAGISTER EN
REPRODUCCION ANIMAL**

Autor: Diego Valdez J.

Director: Dr. Guillermo Serpa G.

Cuenca – Ecuador

2013

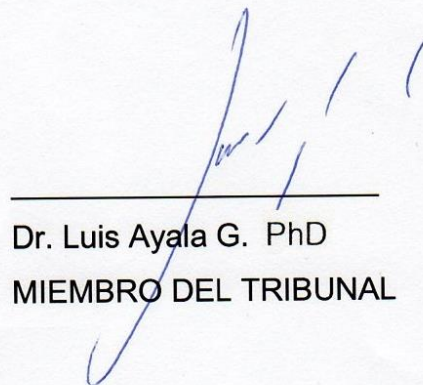
CERTIFICACIÓN:

El Tribunal de tesis y grados CERTIFICA que el presente trabajo de investigación denominado **“EFECTO DEL DODECIL SULFATO IONICO ADICIONADO A UN DILUYENTE LIBRE DE YEMA DE HUEVO SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN OVINO CONGELADO”**, realizado por el maestrante Diego Antonio Valdez Jojoa, ha sido aprobado para su presentación ajustándose a las normas establecidas por el Departamento de Posgrados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Cuenca, 29 de Abril de 2013



Dr. Jhonny Narváez T. Msc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Dr. Luis Ayala G. PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Guillermo Serpa García. Msc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación denominado **“EFECTO DEL DODECIL SULFATO IONICO ADICIONADO A UN DILUYENTE LIBRE DE YEMA DE HUEVO SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN OVINO CONGELADO”** realizado por el maestrante: Diego Antonio Valdez Jojoa, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, ajustándose a las normas establecidas por el Departamento de Posgrados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca; por lo que se autoriza su presentación para los fines legales pertinentes.

Cuenca, 29 de Abril de 2013



DIRECTOR



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Diego Antonio Valdez Jojoa, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Magister en Reproducción Animal. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 29 de Abril de 2013

f).....

Diego Valdez Jojoa.

C.I.: 0301717070

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Fundada en 1867

Yo, Diego Antonio Valdez Jojoa, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 29 de Abril de 2013

f).....

Diego Valdez Jojoa.

C.I.: 0301717070

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que colaboraron para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Del mismo modo mi eterna gratitud a quienes han apoyado esta etapa de crecimiento en mi formación profesional: esposa, amigos, familiares.

Diego Antonio.

DEDICATORIA

Este trabajo dedico con especial agrado a mi esposa,
quien con su sacrificio y constancia me apoyó
incondicionalmente en este nuevo logro profesional.

A mis hijos Camila y Gerhard.

Diego Antonio.

INDICE

Contenido	Pag.
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Objetivos.....	4
1.1.1. General.....	4
1.1.2. Específicos.....	4
1.2. Hipótesis planteada.	4
CAPITULO II	5
2. REVISION DE LITERATURA.	5
2.1. Anatomía Funcional Reproductiva del Carnero.	5
2.1.1. Órganos Reproductivos del Carnero.	5
2.1.2. Células espermáticas o espermatozoides.....	6
2.2. Fisiología Reproductiva del Carnero.....	7
2.2.1. Control endocrino de las funciones sexuales.	8
2.2.2. Espermatogénesis.....	8
2.2.3. Maduración del espermatozoide en el epidídimo.	9
2.2.4. Capacitación espermática.	10
2.2.5. Reacción acrosómica.	12
2.3. Semen del carnero.	13
2.3.1. Factores que afectan la producción y calidad del semen ovino. ...	13
2.3.2. Eyaculación.....	14

2.4.	Valoración de la calidad del espermatozoides.	14
2.4.1.	Volumen.	15
2.4.2.	Color.	15
2.4.3.	pH.	15
2.4.4.	Concentración.	16
2.4.5.	Motilidad.	16
2.4.6.	Morfología.	17
2.4.7.	Integridad de las membranas: plasmática y acrosomal.	18
2.5.	Congelación del semen ovino.	19
2.5.1.	Consideraciones generales.	19
2.5.2.	Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de crioconservación.	20
2.5.3.	Alteraciones de los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación.	23
2.5.4.	Procesamiento y congelación del semen ovino para inseminación artificial.	24
2.5.5.	Diluyentes para congelar semen de ovino.	24
2.5.6.	Aditivos empleados en los diluyentes ovinos.	28
2.6.	Descongelación del semen ovino crioconservado.	30
2.7.	Valoración del espermatozoides congelado-descongelado.	31
2.7.1.	Motilidad y viabilidad.	31
2.7.2.	Integridad de las membranas plasmática y acrosomal.	31
CAPITULO III		33
3.	MATERIALES Y METODOS.	33
3.1.	Materiales.	33
3.1.1.	Físicos.	33
3.1.2.	Químicos.	33
3.1.3.	Biológicos.	34

3.2. Métodos.....	34
3.2.1. Ubicación geográfica.....	34
3.2.2. Diseño estadístico.....	35
3.2.3. Modelo matemático del diseño.....	35
3.2.4. Descripción del diseño experimental.....	35
3.2.5. Caracterización de la unidad de análisis.....	36
3.2.6. Diluyentes seminales empleados en el experimento.....	36
3.2.7. Aditivo aplicado en los diluyentes seminales en el experimento. ...	37
3.2.8. Raza de los carneros.....	37
3.2.9. Criterios de selección de los carneros.....	38
3.2.10. Preparación de los carneros para la recolecta de semen.....	38
3.2.11. Criterios de inclusión y exclusión.....	38
3.2.12. Procedimientos para la ejecución del experimento.....	39
3.2.13. Información levantada.....	43
3.2.14. Análisis estadístico.....	44
CAPITULO IV	45
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Resultados del Análisis Estadístico de las variables estudiadas en el semen ovino crioconservado.....	45
4.1.1. Análisis estadístico de la Motilidad Progresiva “MP”.....	45
4.1.2. Análisis estadístico de la Integridad de la Membrana Plasmática “HOST”.....	48
4.1.3. Análisis estadístico de la Integridad del Acrosoma “ORT”.....	51
4.1.4. Análisis estadístico de los acrosomas intactos “AI”.....	55
CAPITULO V	57
5. DISCUSIONES	57
CAPITULO VI.....	62
6. CONCLUSIONES	62

CAPITULO VII	64
7. RECOMENDACIONES.....	64
CAPITULO VIII	65
8. BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS	74

INDICE DE CUADROS

CUADRO.	Pag
CUADRO N° 1.- Valores medios de la variable “Motilidad Progresiva” obtenidos en el experimento.....	45
CUADRO N° 2.- Análisis de Varianza de la Motilidad Progresiva.	46
CUADRO N° 3.- Valores medios de la variable “HOST” obtenidos en el experimento.	48
CUADRO N° 4.- Análisis de Varianza de la Integridad de la Membrana Plasmática “HOST+”.	48
CUADRO N° 5.- Prueba de significación de Tukey al 5% para la variable HOST.	50
CUADRO N° 6.- Resultados de la prueba de Tukey al 5% para HOST.	50
CUADRO N° 7.- Valores medios de la variable “ORT” obtenidos en el experimento.	51
CUADRO N° 8.- Análisis de Varianza de la resistencia osmótica “ORT”.	52
CUADRO N° 9.- Prueba de significación de Tukey al 5% para la variable ORT.	53
CUADRO N° 10.- Resultados de la prueba de Tukey al 5% para ORT.....	54
CUADRO N° 11.- Valores medios de la variable Acrosomas Intactos “AI” obtenidos en el experimento.	55
CUADRO N° 12.- Análisis de Varianza de los Acrosomas Intactos “AI”.....	55
CUADRO N° 13 Resultados de la prueba de Tukey al 5% de los parámetros de evaluación seminal pos-congelación para el experimento.	58

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico.	Pag.
Gráfico N° 1.- Representación lineal de las medias de la variable “Motilidad Progresiva”.....	47
Gráfico N° 2.- Representación lineal de las medias de la variable “HOST”	49
Gráfico N° 3.- Representación lineal de las medias de la variable “ORT”	52
Gráfico N° 4.- Representación lineal de las medias de la variable “Acrosomas intactos”	56

RESUMEN

El uso de semen ovino congelado se ha limitado a la inseminación laparoscópica por los bajos resultados obtenidos al emplear la vía transcervical y sobre todo a las alteraciones sufridas por los espermatozoides en el proceso de crioconservación. Se ha utilizado aditivos surfactantes (lauril sulfato de sodio) en combinación con los diluyentes a base de TRIS + yema de huevo (YH) con resultados satisfactorios en la crioconservación de semen ovino. No se han reportado resultados al combinarlo con diluyentes que contengan lecitina de soya (LS). El objetivo principal fue determinar las tasas de motilidad progresiva y espermatozoides con membranas: plasmática y acrosomal intactas del semen de carneros de raza pelibuey al emplear un diluyente a base de TRIS + LS combinado con el surfactante lauril sulfato de sodio. Se obtuvo 16 eyaculados divididos en 4 grupos: TRIS + LS; TRIS + LS + surfactante; TRIS + YH; TRIS + YH + surfactante. El semen procesado se envasó en pajuelas de 0,50ml, congelados y almacenados en NL. La motilidad fue evaluada mediante observación al microscopio en escala de 0 a 5. La integridad de membranas se evaluó empleando soluciones de citrato de sodio a 150mOsm y 300mOsm. Los valores HOST y ORT del tratamiento TRIS + LS + surfactante fueron estadísticamente inferiores a los obtenidos en el tratamiento TRIS + YH + surfactante. La motilidad progresiva pos-descongelación no mostró diferencia estadística. El diluyente "TRIS + LS + surfactante" no superó al TRIS + YH + surfactante en la crioconservación de semen de carneros de raza pelibuey. **Palabras clave: semen, carnero, Andromed, surfactante, Triladyl.**

ABSTRACT

The use of frozen sheep semen has been limited to laparoscopic insemination by poor results when using the transcervical because insemination technique employed and overcoat the alterations by sperm cryopreservation process. Surfactants have been used as additives sodium lauryl sulfate in combination with diluents based TRIS + yolk with satisfactory results in semen quality without post-thaw reports results found when combined with diluents containing soybean lecithin. The objective of this research was to determine the rate of progressive motility and intact sperm membranes: plasmatic and sperm acrosomal in Pelibuey rams, to use a TRIS-based extender + soybean lecithin in combination with the surfactant sodium lauryl sulfate to 1%. Ejaculates were obtained 16 divided into 4 groups in which treatments were applied: TRIS + soybean lecithin, TRIS + soybean lecithin + surfactant; TRIS + egg yolk, TRIS + egg yolk + surfactant. Semen processed under these treatments was packaged in 0.50 ml straws, frozen and stored in NL. Motility was evaluated by microscope observation on a scale of 0 to 5. For the evaluation of the integrity of membranes were used solutions of sodium citrate and 300mOsm/l 100mOsm/l. HOST values ORT treatment and TRIS + soybean lecithin + surfactant, were statistically lower than those obtained in the treatment TRIS + yolk + surfactant. The progressive motility post-freezing showed no statistical difference. The diluent "TRIS + soya lecithin + surfactant" not beat TRIS + egg yolk + surfactant in cryopreservation of semen of rams Pelibuey in this research. Keywords: semen, sheep, Andromed, surfactant, Triladyl.

1. INTRODUCCION.

La inseminación artificial (IA) en ovinos no ha repercutido de la misma forma que en los bovinos debido fundamentalmente a la baja fertilidad obtenida con semen congelado al emplear el método de inseminación trans-cervical en el que la dificultad de atravesar el cérvix de la oveja impide depositar el material genético en la luz intrauterina (Córdova, et. al., 2008), y complementada con la baja capacidad fecundante del semen crioconservado concebida por la sensibilidad de los espermatozoides ovinos a la crioconservación. No obstante, con el propósito de mejorar las características cualitativas de las células gametos masculinos, se han realizado trabajos investigativos modificando y/o elaborando diluyentes seminales, o empleando sustancias aditivas con resultados variables (Bittencourt, et. al., 2008; Cabrera, et. al., 2010; Morton , et. al., 2010; Spalekova , et. al., 2011; Guerrero, et. al., 2009).

Probablemente las bajas tasas de fertilidad (25- 40%) así como el impedimento de utilizar el material genético de otras regiones geográficas, se deban a los daños criogénicos que sufren los espermatozoides ovinos durante la crioconservación, por la sensibilidad que muestran estas células a los cambios de temperatura en el proceso de congelación-descongelación. En la célula, los lugares primarios de daños causados por la crioconservación son las membranas: plasmática y acrosomal, estructuras celulares importantes para la sobrevivencia y fertilidad de los espermatozoides (Camara, et. al., 2011). Así, los daños criogénicos se reflejan en el número de espermatozoides inviables con alteración física y funcional de las membranas, fomentada quizás por una baja respuesta del semen ovino a la capacidad crioprotectora de los diluyentes empleados.

Los diluyentes en cuya composición se encuentra yema de huevo, muestran tasas de motilidad progresiva de 42% a 47% y una respuesta a endosmosis positiva (HOST) de 33% a 40% en semen ovino envasado en

pajuelas de 0,25ml (Santiani, et. al., 2007). En semen congelado en la modalidad de pelet y con diluyentes con yema de huevo, al descongelarlo se muestra tasas de motilidad progresiva de 61% y 63%, y tasas del 38% al 43% en relación a la prueba HOST (Cabrera, et. al., 2010).

La utilización de la yema de huevo en los diluyentes seminales ofrece mejor motilidad, termorresistencia y mayor fertilidad in vitro e in vivo pos descongelación lo que no ha sido visto en diluyentes en donde se ha remplazado este componente con la suplementación de trealosa y glicina, asociada a la sustitución de glucosa por fructosa, más fácilmente metabolizada por el espermatozoide (Camara , et. al., 2011). Sin embargo, la composición de la yema de huevo no es constante pudiendo variar según la especie, raza, edad del ave, tipo de alimentación e influencia en la calidad del semen procesado. Además, existe la tendencia de remplazar los componentes de origen animal (yema de huevo, leche, albumina sérica bovina) por componentes sintéticos en la preparación de los diluyentes para reducir el riesgo de contaminaciones por bacterias y micoplasmas, y mantener un estándar de producción por permanecer constante su composición, así la lecitina de soya se emplea en remplazo de la yema de huevo (Fukui, et. al., 2008; Del Valle , et. al., 2011).

Tanto los diluentes sintéticos como los convencionales no muestran diferencias estadísticamente significativas en las tasas de fertilidad al inseminar intrauterinamente por laparoscopia (Fukui, et. al., 2008) y coincide con las tasas similares al test de endosmosis positiva (Santiani, et. al., 2007), (Cabrera, et. al., 2010). No obstante, se ha investigado la utilización de surfactantes (DSI al 0,5%, 0,7%, 1%) adicionados a diluyentes con yema de huevo como aditivos en la congelación de semen ovino con un efecto benéfico en la calidad del mismo (motilidad progresiva e integridad de las membranas plasmática y acrosomal) en ovejas de pelo (Deneb, et. al., 2012) efecto similar se ha visto en semen caprino al emplear una concentración de 0,5% (Bittencourt, et. al., 2008).

Este trabajo investigativo se realizó con la finalidad de comprobar la replicación de los efectos benéficos de la adición del surfactante dodecil sulfato iónico (DSI, DSI) sobre la motilidad progresiva e integridad de las membranas plasmáticas en los diluyentes seminales sintético a base de TRIS + lecitina de soya (Andromed®) el mismo que por si solo elimina el riesgo de contaminación bacteriana y otros microorganismos, además de mantener su composición constante y reducir las variaciones indeseables en la calidad del semen procesado.

1.1. Objetivos.

1.1.1. General.

Determinar las tasas de motilidad espermática progresiva y espermatozoides con membranas: plasmática y acrosomal intactas en semen ovino crioconservado.

1.1.2. Específicos.

- Comparar la eficacia protectora en la crioconservación de semen ovino de los diluyentes: Tris+ yema de huevo, Tris + yema de huevo + surfactante, Tris + lecitina de soya y Tris +lecitina de soya + surfactante.

1.2. Hipótesis planteada.

Ha. La adición del surfactante Dodecil Sulfato Iónico (Equex STM®) a un diluyente sintético a base Tris y lecitina de soya (Andromed ®) aumenta la motilidad espermática progresiva y un mayor número de espermatozoides con membranas plasmática y acrosomal íntegras en el semen ovino crioconservado, en proporción mayor que la aplicación del diluyente convencional Tris y yema de huevo (Triladyl®).

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1. Anatomía Funcional Reproductiva del Carnero.

El estudio anatómico y funcional del aparato reproductivo del carnero comienza en los testículos los cuales producen los espermatozoides. Los testículos penden entre las extremidades posteriores dentro de un saco de piel o escroto, éstos suben y bajan por acción de los músculos que se encuentran en las paredes del escroto y en el cordón espermático lo que permite al animal mantener la temperatura constante. Los espermatozoides salen del testículo a través de los conductos eferentes y llegan al epidídimo a su porción craneal (cabeza del epidídimo), después de atravesar el cuerpo del epidídimo llega a la porción terminal o cola, donde se almacenan hasta pasar al conducto deferente el cual penetra en la uretra en donde se incorpora con las secreciones producidas por las glándulas vesiculares, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Estas secreciones actúan como medio de transporte para los espermatozoides y toma el nombre de semen. El semen pasa por el segmento uretral que corresponde al pene el mismo que se origina en el periné (bajo el ano), luego se desplaza por la "S" peneana hasta alcanzar al glande y salir al exterior en el momento de la eyaculación. Los músculos retractores del pene mantienen a este dentro del prepucio, que lo protege mientras está relajado (Hafez, et. al., 2004; Hintz, et. al., 1987).

2.1.1. Órganos Reproductivos del Carnero.

Con lo anteriormente dicho y en forma resumida los órganos reproductivos del carnero son: escroto, testículos, conducto eferente, epidídimo con sus tres porciones (cabeza, cuerpo y cola), plexo pampiniforme, conducto deferente, uretra, glándulas vesiculares, próstata, glándulas bulbouretrales, pene y flexura sigmoidea, cuerpo del pene y glande (Figura N° 1) (Hafez, et. al., 2004; Hintz, et. al., 1987; Illera, 1994; Evans, et. al., 1990).

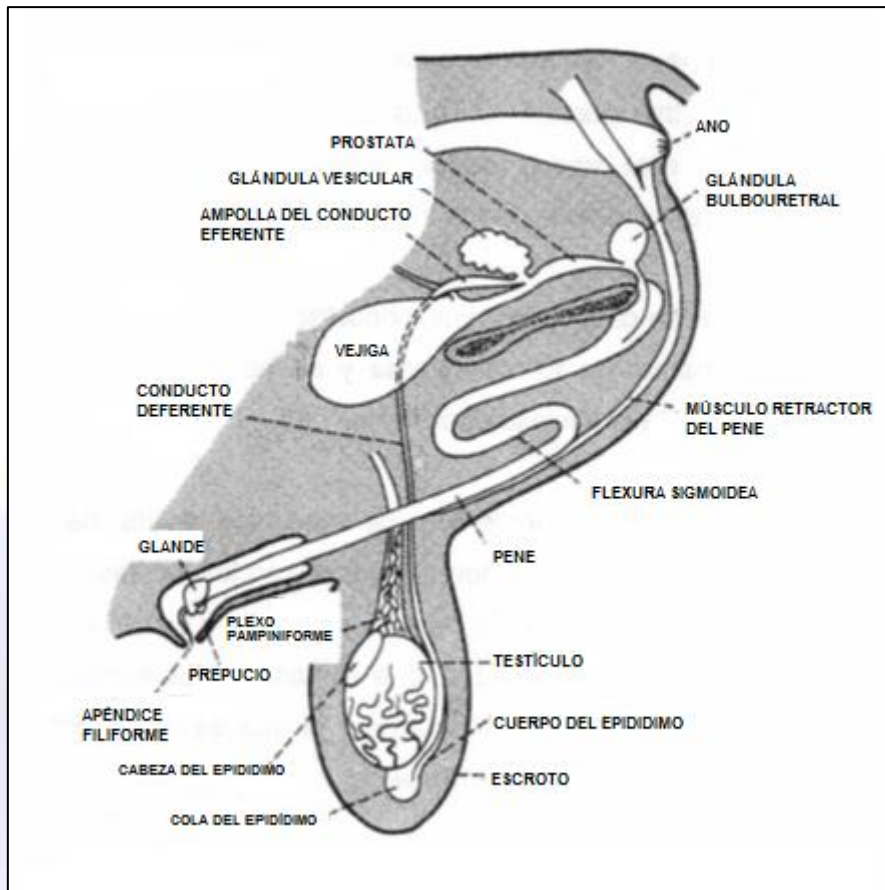


Figura N° 1. Aparato Reproductivo del Carnero.

Fuente: Boletín INIA N° 16 (Latorre, et. al., 2000).

2.1.2. Células espermáticas o espermatozoides.

Los espermatozoides son células especializadas para la fecundación del oocito, se forman en los túbulos seminíferos de los testículos a través de una serie de células germinales en desarrollo. Estas células son de forma alargada formadas por cabeza y cola, recubierto por la membrana plasmática además presenta una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide conocido como acrosoma (Hafez, et. al., 2004). La cola del espermatozoide, en forma de flagelo, le permite desplazarse en los líquidos, consta de tres regiones: pieza proximal, pieza principal o intermedia y pieza terminal (Evans, et. al., 1990).

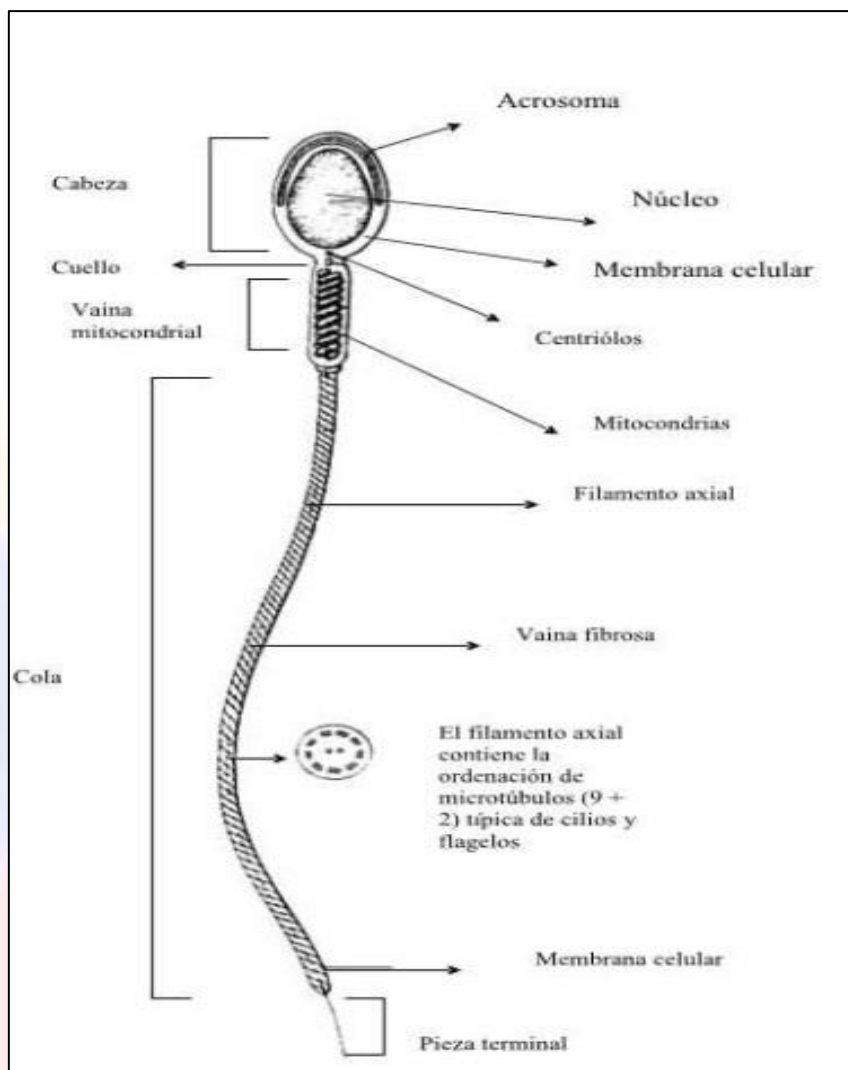


Figura N° 2. Esquema de las estructuras de un espermatozoide.

Fuente: SERIDA- Información Ganadera (Hidalgo, et. al., 2005)

2.2. Fisiología Reproductiva del Carnero.

La fisiología reproductiva de los machos de cualquier especie incluyendo la ovina puede definirse como la capacidad que tiene el testículo para producir gametos (espermatozoides), en cantidad y con la calidad, suficientes para llevar a cabo la fertilización, además de producir las hormonas sexuales que llevarán a la maduración sexual del individuo (Méndez, et. al., 2009) y producir una serie de efectos y conductas del carnero como la presencia de libido o deseo sexual (Latorre, et. al., 2000).

En la especie ovina, al igual que en todos los mamíferos, el proceso reproductivo está gobernado por el Sistema Nervioso Central (SNC). Este control es mediado por el hipotálamo el cual interactúa con la hipófisis y la glándula pineal. Las hormonas producidas en estos tres elementos afectan a la función de las gónadas masculinas (testículos). Las interacciones entre las gónadas, las glándulas reproductivas y el cerebro constituyen el eje central que controla la funcionalidad reproductiva del carnero (Muñoz, 2001).

2.2.1. Control endocrino de las funciones sexuales.

Los mecanismos neuroendocrinos que regulan las funciones reproductivas del macho son fundamentalmente similares a los que regulan las funciones sexuales de la hembra. La acción hormonal comienza en el macho con las hormonas de liberación del hipotálamo (GnRH). A la vez, la adenohipófisis y las gónadas producen otras secreciones. En el caso de la hipófisis produce hormona Folículo Estimulante o FSH, y hormona Luteinizante o LH, mientras que los testículos generan los andrógenos (principalmente testosterona). La interacción de todas ellas regula las estructuras y funciones reproductivas del macho (Hintz, et. al., 1987). La secreción de testosterona por los testículos es el resultado de la estimulación de las células de Leydig por la LH u hormona estimulante de las células intersticiales ICSH y a la vez es la principal hormona reguladora de la secreción de LH o ICSH. La retroalimentación negativa de la testosterona es ejercida a nivel hipotalámico por la acción de la inhibina producida en las células de Sertoli. El control endocrino de la espermatogénesis depende de las acciones de FSH, LH y testosterona. El sitio blanco de la LH son las células intersticiales o de Leydig; el de la FSH son las células de sostén o de Sertoli; y el sitio blanco de la testosterona son las células de Sertoli y posiblemente también las células germinales (Galina, et. al., 2009; Hafez, et. al., 2004).

2.2.2. Espermatogénesis.

La espermatogénesis es el proceso de división y diferenciación en donde se producen espermatozoides, este evento se desarrolla en el epitelio basal de

los túbulos seminíferos de los testículos, apareciendo en dicho lugar aproximadamente a los cinco meses de edad en los carneros y alcanzando su capacidad fertilizante normal pocos meses después (Arthur, et. al., 1991). La espermatogénesis se caracteriza por la división por mitosis de las células espermatogonias troncales con la finalidad de mantener su propio número y producir cíclicamente espermátocitos que por proceso de meiosis producirán espermátides aploides las cuales se diferencian en espermatozoides. En el carnero todo este proceso dura aproximadamente 47 días (Illera, 1994).

No obstante, la espermatogénesis es un proceso fisiológico reproductivo y como tal está controlado por los mecanismos neuroendócrinos; así, las etapas de espermatogonias (A y B) y espermátocito primario en la profase meiótica están influenciadas por la hormona FSH, mientras que el espermátocito primario en profase y metafase, así como el espermátocito secundario están controlados por la testosterona y que al convertirse en espermátide para luego diferenciarse como espermatozoide maduro, a más de la testosterona, está regulado por la hormona folículo estimulante FSH (Illera, 1994; Hafez, et al., 2004; Hintz, et al., 1987).

2.2.3. Maduración del espermatozoide en el epidídimo.

Los espermatozoides una vez que caen a la luz de los túbulos seminíferos, son transportados desde los testículos hacia la cabeza del epidídimo conservando la gota citoplasmática formada en el proceso de espermatogénesis y que poco a poco desaparece hasta llegar a la cola del epidídimo (Arthur, et. al., 1991). Además de eliminar la gota citoplasmática, los espermatozoides adquieren lentamente la capacidad de motilidad progresiva a medida que se alejan del testículo y llegan a la cola epididimal seguido de su paso al conducto deferente (Hafez, et. al., 2004).

La maduración espermática se produce gracias a la acción de la capa ciliada ubicada en la luz del epidídimo, la cual es semejante a un cepillo y funciona como peine para los espermatozoides a medida que estos pasan por esta estructura. Este efecto mecánico permite que el material citoplasmático en

exceso, a medida que el gameto masculino inmaduro avanza hacia la cola del epidídimo, vaya siendo arrastrado desde la cabeza hacia la cola del espermatozoide hasta ser eliminado al llegar a la porción terminal del epidídimo (cola) completando la maduración espermática (Arthur, et. al., 1991; Hafez, et. al., 2004; Hintz, et. al., 1987).

2.2.4. Capacitación espermática.

La capacitación es un proceso del espermatozoide que comprende una serie de cambios previos a la fecundación y que normalmente ocurre en el tracto reproductor femenino de los vertebrados de fecundación interna en los que se incluye a la especie ovina. La capacitación espermática es un término que indica el desarrollo funcional que sufre el espermatozoide, y es una serie de cambios o modificaciones estructurales y funcionales como resultado de su interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor femenino (Arenas, et. al., 2010; Grasa, et. al., 2009). En las modificaciones que se producen se incluyen cambios bioquímicos y fisiológicos donde se alteran y eliminan sustancias que fueron integradas en la membrana plasmática del espermatozoide cuando pasaron por el epidídimo o durante la exposición al plasma seminal y la depleción de colesterol, resultando en un incremento en la permeabilidad de la membrana al calcio (aumento del calcio intracelular), aumento de los canales de calcio y sodio/potasio, generación de especies reactivas de oxígeno y fosforilación de la tirosina de las proteínas (Rodríguez, et. al., 2008).

Durante la capacitación el espermatozoide experimenta muchos cambios físicos así como cambios en la composición lipídica de su membrana plasmática siendo el más importante la disminución de la relación colesterol: fosfolípidos afectando la permeabilidad de la membrana; el colesterol es el esteroide presente en mayor concentración en el eyaculado con un conocido efecto estabilizador sobre las membranas celulares, este elemento es desprendido de la membrana plasmática por acción de las lipoproteínas de alta densidad presentes en las secreciones del tracto reproductor femenino, por lo tanto, una vez que los espermatozoides han sido depositados en el tracto

genital de la hembra, las proteínas seminales contenidas en la superficie espermática contactan con los fosfolípidos de alta densidad presentes en el oviducto, adquiriendo la facultad de secuestrar el colesterol y otros fosfolípidos resultando en una alteración de permeabilidad de la membrana espermática la que permite la entrada de calcio que convierte los fosfolípidos en lisofosfolípidos capaces de desestabilizar membranas y así comenzar con la reacción acrosómica (Mayren, et. al., 2012; Boerke, et. al., 2012). En si mismo, la capacitación espermática representa una desestabilización de las membranas acrosomales, esto finalmente se traduce en un aumento de la ocurrencia espontánea de la exocitosis acrosomal disminuyendo a su vez la vida media de la población de espermatozoides. Todos los cambios que ocurren durante la capacitación espermática conducen al aumento del metabolismo y la motilidad del espermatozoide (Mayren, et. al., 2012).

En breves palabras, las modificaciones lipoproteicas de las membranas permiten la exteriorización de los receptores y activan canales iónicos que intervienen en la activación de mecanismos de transducción (flujo de calcio, síntesis de AMPc, fosforilación-desfosforilación de proteínas, etc.), y cambian el metabolismo energético que conducen a la desestabilización de la membrana plasmática a nivel de la región acrosómica y la hiper-activación del movimiento flagelar. Estos cambios permiten al espermatozoide responder a inductores específicos y experimentar la reacción acrosomal al fin de la capacitación (Arenas, et. al., 2010).

La crioconservación del semen genera en el espermatozoide cambios similares a la capacitación espermática denominándose criocapitación y que al utilizar el semen crioconservado para la fertilización *in vitro*, la etapa de capacitación espermática inducida puede ser innecesaria. Sin embargo, los cambios inducidos por la crioconservación reducen las tasas de concepción al usar semen crioconservado para inseminación artificial (Rodríguez, et. al., 2008).

2.2.5. Reacción acrosómica.

Cuando el espermatozoide se une al ovocito, se induce otro proceso denominado reacción acrosomal (exocitosis), así como la hiper movilidad, que es un movimiento especial del flagelo, el cual facilita su desplazamiento, la penetración de las cubiertas del ovocito y finalmente la unión con éste (Arenas, et. al., 2010). La reacción acrosomal (RA) ocurre de forma espontánea, siendo de interés por su participación en la preparación final de los espermatozoides antes de la penetración de la Zona Pelúcida (ZP) (Del Río, et. al., 2007). Sin embargo, trabajos realizados en la fertilización *in vitro* indican que la reacción acrosómica puede ser inducida empleando diferentes sustancias como heparina, ionóforo de calcio, fluido sintético de oviducto y progesterona (Chávez, et. al., 2008).

La RA es especie específica, e implica la existencia de moléculas para el reconocimiento entre los gametos masculino y femenino y generar la respuesta fisiológica adecuada. Hay fusión de membrana plasmática y acrosomal externa en varios sitios, formando vesículas que se desprenden, quedando la membrana acrosomal interna ahora como nueva membrana de superficie. Las vesículas liberan su contenido a medida que el espermatozoide penetra a través de la ZP. Bioquímicamente la reacción acrosomal se caracteriza por la activación de las enzimas acrosomales y la secreción de algunas de ellas, antes de la formación de vesículas. El calcio desempeña un papel fundamental en todos los mecanismos de exocitosis, principalmente el Calcio extracelular (Arenas, et. al., 2010).

En resumen, para que se de la reacción acrosómica es necesario que el espermatozoide sufra la debida capacitación espermática acompañada de la hiperactividad, aumento de calcio intracelular, disminución del contenido de colesterol, activación de las enzimas hidrolíticas generada por el aumento de pH intra-acrosomal, y regulación de la exocitosis (Del Río, et. al., 2007).

2.3. Semen del carnero.

El semen puede ser definido como la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino (glándulas accesorias, epidídimo, testículo y conductos deferentes). El plasma seminal constituye la porción fluida de esa suspensión, que es liberada en la eyaculación. Los espermatozoides son provenientes de los túbulos seminíferos localizados en el interior de los testículos los cuales contienen una serie de complejas células germinativas en desarrollo, que dan origen a los gametos masculinos a través de la espermatogénesis (Hafez, et. al., 2004).

2.3.1. Factores que afectan la producción y calidad del semen ovino.

El proceso de la reproducción es un sistema fisiológico importante para el desarrollo de las especies y está ligado al estrés ambiental y por manejo. El primero incluye a la temperatura del ambiente (frío y/o calor), al viento y a la humedad. El estrés por manejo incluye a los procedimientos de manejo mismo, al flujo de animales, ruido, trauma físico, transporte, aislamiento de los animales, etc. La combinación de ambos tipos de estrés compromete al bienestar animal y su desempeño (Córdova , 2008).

La fertilidad de los carneros varía significativamente y la única garantía reproductiva es el número y calidad de su progenie producidas bajo condiciones normales; no obstante, los principales factores que alteran la producción de espermatozoides en los carneros se engloban en aspectos de salud, edad y conformación de los carneros, nutrición, manejo así como factores medioambientales (Melling, et. al., 2000) siendo los de mayor influencia en la producción de semen. Así, la temperatura ambiental provoca una disminución en la concentración y motilidad espermática (total y progresiva), y un aumento en el pH y el porcentaje de espermatozoides anormales y muertos, sin afectar el volumen de eyaculado ni el deseo sexual (Córdova , 2008).

2.3.2. Eyaculación.

La eyaculación comienza con la aparición de la libido o deseo sexual en el carnero de lo cual es responsable la testosterona. La presencia de una hembra en celo aumenta la actividad sexual del macho por lo que procura montar a cualquier hembra. El carnero se vale de las feromonas presentes en el aire que han sido liberadas por las ovejas en celo, las mismas que son captadas por el sentido del olfato. En condiciones de apareamiento natural el carnero busca ovejas en celo, huele su vulva y se empuja contra la grupa de estas. Antes de la monta se observa escurrimientos de líquidos a través de la vaina. El pene se mantiene dentro de la vaina hasta que el animal monta, entonces se da la extensión, el movimiento de propulsión (golpe de riñón), seguido de la eyaculación y desmonta (Hintz, et. al., 1987; Hafez, et. al., 2004). La eyaculación puede ser inhibida por factores externos (presencia de personas extrañas, fallos en la vagina artificial englobados en temperatura y presión), factores fisiológicos (dolor, lesiones musculares y articulares), factores patológicos (adherencias en el pene, enfermedades) (Illera, 1994; Melling, et. al., 2000).

2.4. Valoración de la calidad del esperma.

Al igual que en otras especies, el eyaculado de los carneros varía en volumen y calidad dependiendo del estado sanitario, nutricional, influencia medioambiental y actividad sexual. Las características de calidad que se valoran en el semen inmediatamente después de su obtención son: color, volumen, concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides (Evans, et. al., 1990). La muestra de semen a valorar deberá estar carente de orina, pelos o cualquier otro material extraño (Illera, 1994).

Considerando que los espermatozoides son sensibles al shock térmico, la luz brillante, detergentes, agua, sangre, desinfectantes, metales, humo de cigarrillo, y temperaturas mayores a 40°C, todo el equipo usado para su

examen debe estar libres de contaminantes y ser mantenido alrededor de 37°C (Melling, et. al., 2000).

2.4.1. Volumen.

El volumen del semen depende del método de recolección, la edad y estado del carnero, la habilidad del recolector y la frecuencia de obtención de muestras (Hafez, et. al., 2004; Evans, et. al., 1990). En una investigación realizada empleando diferentes métodos de recolección de semen, se determino que la vagina artificial es el mejor método para la obtención de semen en el ganado ovino, sin perder características de importancia para la capacidad fecundante de los espermatozoides (Vera, 2009). El volumen normal de eyaculado por carnero adulto es de 0,5ml a 2ml y en carneros jóvenes de 0,5 a 0,7ml (Hafez, et. al., 2004; Evans, et. al., 1990).

2.4.2. Color.

Es un parámetro que se toma en cuenta bajo condiciones de campo y se realiza observando la opacidad de la muestra dentro del tubo de recolección; una muestra se clasifica como: buena, cuando la muestra es de color crema y de consistencia espesa; regular, cuando tienen una tonalidad grisácea; y mala cuando la coloración es blanco diluido (Hintz, et. al., 1987). El semen del carnero es de color crema pálido o lechoso. La coloración rosácea indica presencia de sangre, el semen gris indica o sugiere contaminación del tracto reproductivo. El semen amarillento y diluido es indicativo de contaminación con orina (Hafez, et. al., 2004; Evans, et. al., 1990).

2.4.3. pH.

La cuantificación del grado de acidez o alcalinidad de una muestra de semen aporta información respecto a la calidad del mismo. El pH es también medida de la actividad metabólica de los espermatozoides. Conforme estos últimos envejecen, se produce ácido láctico como resultado de la glucólisis; la acumulación del ácido disminuye el pH, lo que a la vez reduce la motilidad de

los espermatozoides. El pH del eyaculado del carnero se ubica en un rango de 5,9 a 7,3 (Hintz, et. al., 1987), el aumento de pH es indicador de contaminación con orina (Illera, 1994).

2.4.4. Concentración.

La determinación del número de espermatozoides por ml de eyaculado definen el número de hembras que pueden ser inseminadas. La concentración normal en carneros se ubica de $3,5 \times 10^9$ a $6,0 \times 10^9$ espermatozoides/ml. La concentración se mide en forma directa usando hemocitometría, densimetría (método de Karras) o espectrofotometría (Hafez, et. al., 2004; Evans, et. al., 1990; Melling, et. al., 2000; Illera, 1994).

La medición de la circunferencia o perímetro escrotal es una manera indirecta de cuantificar la concentración espermática. La producción de espermatozoides es un proceso continuo en el carnero y puede llegar a ser cercana a los 20 millones de espermatozoides por gramo de tejido testicular. No obstante, se ha demostrado que el perímetro escrotal está asociado positivamente con la movilidad espermática, la calidad del semen y la producción de espermatozoides; y negativamente con los defectos espermáticos primarios (Vera, 2009).

2.4.5. Motilidad.

Implica la estimación de la viabilidad de los espermatozoides y la calidad de la motilidad, y al ser susceptible a las condiciones ambientales (calor o frío), es necesario proteger el semen antes del análisis. Los parámetros de motilidad incluyen: porcentaje de espermatozoides en movimiento (normal 70 a 90%), porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, velocidad espermática (0 = estacionaria, 4 = rápida), longevidad de la motilidad espermática en semen puro (temperatura ambiente 20 a 25°C) y en semen diluido (temperatura ambiente o de refrigeración 4 a 5°C) (Hafez, et. al., 2004). La valoración por onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la movilidad del semen fresco, las muestras de semen destinadas a

inseminación artificial serán las calificadas como muy buenas y buenas (puntuación de 4 y 5) (Evans, et. al., 1990).

El movimiento espermático es un atributo de la calidad porque determina la eficacia de la migración a través del tracto genital de la hembra. Puede ser efectuado a través de una evaluación del movimiento de la masa y del movimiento individual de los espermatozoides de un eyaculado valorando en forma general la calidad del eyaculado. Esta evaluación es esencialmente subjetiva, llevando a una alta variabilidad entre los observadores (30 a 60%). Sin embargo se han desarrollado nuevos sistemas de valoración seminal a través de procesadores de imágenes asistidos computacionalmente conocidos como Análisis Espermático Asistido Computacionalmente “CASA” (por sus siglas en inglés) que a más de evaluar la motilidad espermática, permite evaluar significativamente otros parámetros como morfología y velocidad espermática (Vera, 2009).

2.4.6. Morfología.

Las anomalías morfológicas espermáticas están relacionadas con la fertilidad o infertilidad del macho y se asocian con las condiciones medioambientales que ocasionan estados de estrés (especialmente calor y humedad) (Hafez, et. al., 2004). El examen morfológico es una prueba de control de calidad del semen, con una proporción muy alta (mayor a 20%) de espermatozoides anormales presentes en la muestra seminal, ésta será calificada de baja calidad fértil (Evans, et. al., 1990). En carneros, los eyaculados con 15% o más de espermatozoides anormales no se usarán para programas de inseminación artificial (Hafez, et. al., 2004). Las formas anormales se clasifican como anomalías de cabeza (defectos de acrosoma, cabezas sueltas anormales, piriformes, estrechos en la base, contorno anormal, tamaño diferente); de pieza media (anormal o abaxial); de cola (doblada simple, doblada terminal); gotas citoplasmáticas proximales o distales y cabezas sueltas normales (López, et. al., 2011).

2.4.7. Integridad de las membranas: plasmática y acrosomal.

La membrana plasmática (MP) del espermatozoide representa una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones que permiten la adaptación del metabolismo al medio circundante, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del oocito. Por lo cual la valoración de la integridad y funcionalidad de la MP constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho. Un aspecto muy relevante al inferir sobre la integridad es evaluar la funcionalidad espermática (capacidad funcional del espermatozoide) dirigida a determinar la integridad funcional de la MP y acrosomal. El valor de esta integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que es imprescindible en varios eventos de la fecundación como la capacitación, reacción del acrosoma o su fusión con el ovocito (Urrego, et. al., 2008). Un grupo de pruebas de funcionalidad espermática que ha centrado un gran interés por su simplicidad y su valor predictivo son las de resistencia osmótica que se basan en la capacidad del espermatozoide para captar agua en un medio hiposmótico ocurriendo un enrollamiento del flagelo del espermatozoide que se desdobra cuando la célula es devuelta a un medio iso-osmótico, al evaluar la membrana plasmática; mientras que para la evaluación del acrosoma, éste no muestra cambios en su estructura cuando no está alterado al ser sometido de igual manera a medios hipo-osmóticos. Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destacan las dos más utilizadas: el HOST y el ORT (Rubio, et. al., 2008). La integridad del acrosoma y la membrana plasmática se evalúa según su capacidad funcional a los cambios osmóticos reaccionando estas membranas cuando se exponen a soluciones hipo-osmóticas e incubadas a 37°C por 30 minutos, siendo el ORT (Osmotic Resistent Test) para determinar la integridad del acrosoma y el HOST (Hipoosmotic Swelling Test) para determinar la integridad de la membrana plasmática (Rubio, 2009). No obstante, existen otros métodos para evaluar las estructuras antes mencionadas, en donde se emplean las tinciones fluorescentes, empleando para ello diferentes moléculas como lecitinas y anticuerpos conjugados con fluorocromos (Hafez, et. al., 2004; Galina, et. al., 2009).

2.5. Congelación del semen ovino.

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial han causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana, debido a que favorece el comercio nacional e internacional de razas o líneas genéticas, formación de bancos de germoplasma, reserva genética, conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Al igual que en la transferencia de embriones, el riesgo y costo del transporte de semen es menor que el transporte del animal para servicio natural. Así mismo, el uso de semen congelado puede eliminar las cuarentenas y disminuir los riesgos de la transmisión de enfermedades (Choez, 2010). La congelación del semen para su conservación se realiza a muy bajas temperaturas (-196°C), a esta temperatura las reacciones metabólicas de los espermatozoides se detienen pudiendo conservarlo durante mucho tiempo, además se facilita su transporte ampliando considerablemente la utilización de los sementales (Evans, et. al., 1990).

2.5.1. Consideraciones generales.

Previo a la congelación del semen ovino hay que tener presente el método de recolección del eyaculado; así, la vagina artificial es el método más apropiado para la recolección del semen de carnero destinado a programas de inseminación artificial (Hafez, et. al., 2004; Melling, et. al., 2000; Vera, 2009). Para obtener un eyaculado concentrado y de alta calidad, el carnero debe ser estimulado sexualmente por sujeción activa de monta sin recolección (monta falsa) (Laing, et. al., 1990). Así también, el material que va a entrar en contacto con la muestra de semen debe estar estéril, atemperado a 30°C - 35°C y libre de sustancias que produzcan daño a los espermatozoides (Illera, 1994).

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir, en la célula espermática, daños letales o sub-letales los cuales comprometen su funcionalidad. La optimización de protocolos de criopreservación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides

sobrevivientes sino también la habilidad funcional de esta población. Para lograr esto, es necesario comprender a que tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos descongelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales (Choez, 2010).

Hay que tener presente que el espermatozoide cuando se someten a los procesos de crioconservación sufre daños estructurales y bioquímicos en donde factores como el shock térmico, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico influyen sobre los resultados pos-descongelación y son responsables de la disminución de la fertilidad (Cabrera, et. al., 2010).

2.5.2. Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de crioconservación.

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son: la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Galina, et. al., 2009; Choez, 2010).

La membrana del espermatozoide sufre una amplia variedad de daños durante el proceso de congelación. La causa principal de estos cambios es debida a alteraciones térmicas, mecánicas y químicas, asociados a la acción previa de los criopreservantes, cambios volumétricos, en parte dependientes del balance Na^+ / K^+ ligado al aporte de ATP intracelular, indicando que podría estar implícito un fracaso metabólico, y en parte dependiente de variaciones osmóticas puntuales, desestabilización de proteínas ligadas al citoesqueleto y la formación de cristales de hielo (Galina, et. al., 2009; Hafez, et. al., 2004).

Los daños en las membranas plasmáticas se debe a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C a 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad; durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Ávila , et. al., 2006).

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol, y posteriormente cuando la solución es congelada. Mas tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para soportar la injuria a la que se ve sometida (Stornelli, et. al., 2005; Galina, et. al., 2009).

Otro factor que afecta la viabilidad espermática en la crioconservación es el shock térmico, dado por el enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C induciendo un estrés letal y el aumento de la permeabilidad de la membrana en algunas células viéndose afectada la regulación del calcio, por lo que debe realizarse cuidadosamente. El shock térmico por frío es considerado como el estado extremo de un stress continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia por lo que la agregación de preparaciones lipídicas purificadas al diluyente reduce significativamente este fenómeno y el daño producido por la congelación-descongelación. Usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad y alto peso molecular posee un efecto protector contra el shock de frío al actuar sobre la superficie celular (Stornelli , et. al., 2005).

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas, reduciendo la concentración de electrólitos del medio celular interno y posibilitando la supervivencia al permitir que el agua intracelular salga al exterior y se congele durante el proceso de criopreservación, la célula se deshidrata y evita que se forme cristales de hielo internamente. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides y que está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores. Este estrés osmótico afecta los fosfolípidos de la membrana plasmática aumentando la permeabilidad y fusionándola con el acrosoma. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por el glicerol posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica pudiendo ser reducido mediante la incorporación en etapas del glicerol en el medio de congelación en el proceso de criopreservación lo que permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado (Stornelli , et. al., 2005; Ávila , et. al., 2006).

Los espermatozoides poseen una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación. Si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta, el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta. El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada. Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo forman núcleos y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida aumentando la presión osmótica de la solución en dependencia de la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada. En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevivencia, lo que implica que el enfriamiento celular debería ser a una velocidad adecuada que permita disminuir la exposición de los espermatozoides a los eventos antemencionados y a su vez permitir la salida de agua intracelular gradualmente gracias a la

presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula (Stornelli , et. al., 2005).

2.5.3. Alteraciones de los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación.

Los espermatozoides de carnero son muy sensibles a los cambios de temperatura durante el proceso de congelación descongelación; así, los daños criogénicos que ocurren en el espermatozoide ovino luego de congelar el semen, se muestran en el momento en que éste es descongelado (Holt, et. al., 1994). El grado de daño depende de un efecto combinado de varios factores incluyendo la temperatura y velocidad de congelación (Ashrafi , et. al., 2011).

Luego de la crioconservación disminuye la motilidad espermática, dado por la heterogeneidad de la población de células espermáticas presentes en el semen al momento de la congelación. Los espermatozoides descongelados muestran movimiento de intensidad variable relacionándose con la pobre capacidad fecundante del semen congelado (Stornelli , et. al., 2005).

En la célula espermática, los lugares primarios de daños causados por la crioconservación son las membranas: plasmática y acrosomal, estructuras celulares importantes para la sobrevivencia y fertilidad de los espermatozoides (Camara , et. al., 2011). La agrupación de las proteínas de la membrana celular durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es enteramente reversible comprometiendo la estructura de los receptores y en consecuencia sobre la interacción entre gametos (espermatozoide-óvulo). La crioconservación induce a que los espermatozoides sufran una aparente capacitación mostrando un aumento de calcio libre intracelular y cambios típicos de este evento como la reacción acrosomal (Stornelli , et. al., 2005). La reacción del acrosoma es el contribuidor esencial para la fertilización porque solo con esta reacción el espermatozoide puede penetrar la zona pelúcida y fusionarse con el oocito, y su daño impide la viabilidad del espermatozoide (Gadea, 2003; Hafez, et. al., 2004)

2.5.4. Procesamiento y congelación del semen ovino para inseminación artificial.

El semen del carnero se puede congelar empleando la metodología convencional (congelación lenta) o la metodología rápida (congelación rápida) pudiendo emplearse para el efecto pajuelas de plástico, ampollitas o pellets; el semen congelado con la metodología rápida mejora la supervivencia de los espermatozoides (Evans, et. al., 1990). El plasma seminal no contiene las sustancias suficientes para mantener la viabilidad del eyaculado por largos periodos de tiempo por lo que es imprescindible la adición de agentes crioprotectores que prolonguen la vida de las células espermáticas destinadas a inseminación artificial (Illera, 1994). El método de congelación de un solo paso es ampliamente empleado en la congelación de semen de carnero por su simplicidad y menor manejo del semen antes de su congelación; para hacer la dilución de un solo paso, el semen se diluye a la dilución final de pre-congelación a 30°C con diluyente que contiene glicerol y luego se refrigera a temperatura de 5°C por 1,5 a 2 horas para luego ser expuestas a vapores de nitrógeno líquido y posterior sumergimiento en el mismo (Evans, et. al., 1990). La motilidad y concentración establecen la proporción a la que se diluye el semen. El almacenamiento se lo realiza en contenedores de nitrógeno líquido (Hafez, et. al., 2004; Galina, et. al., 2009). En forma resumida la secuencia de eventos para el procesamiento y congelación de semen ovino sería: a) preparación de los materiales; b) recolección; c) evaluación; d) dilución; e) enfriamiento; f) congelación; y g) almacenamiento (Evans, et. al., 1990; Illera, 1994).

2.5.5. Diluyentes para congelar semen de ovino.

Los diluyentes tienen dos funciones básicas: el mantenimiento de la fertilidad durante la crioconservación y la dilución del eyaculado para alcanzar el número apropiado de espermatozoides por dosis inseminante (Laing, et al., 1990). Los diluyentes del semen deben contener: un sustrato energético (azúcar), una concentración apropiada de electrolitos para proteger a los espermios de los cambios de pH y presión osmótica (solución tampón),

componentes de alto peso molecular para proteger a las células de los efectos nocivos del frío y estabilizar las membranas durante la congelación (lecitina, proteínas, lipoproteínas), un agente crioprotector (glicerol) y antibióticos (Illera, 1994; Laing, et. al., 1990). El medio Tris-glucosa-yema de huevo de un solo paso, es el más adecuado para la dilución de semen de carnero en pajuela o pelets (Evans, et al., 1990).

2.5.5.1. Sustrato Energético.

En la composición de los diluyentes seminales incluyen los carbohidratos porque estos brindan energía a las células espermáticas. Los carbohidratos pueden ser preferiblemente un azúcar de metabolismo simple y que las células pueden utilizarlo como fuente de energía (Laskutoff, et. al., 2010). El sustrato de energía más frecuente utilizado en la composición de los diluyentes es la glucosa, aunque se han usado también la galactosa, fructosa, ribosa y trehalosa pero con resultados inferiores (Galina, et al., 2009; Illera, 1994). Los carbohidratos pueden ser usados solos o en combinación y pueden ser provistos en la composición del diluyente usando una solución en una cantidad suficiente para proveer a los espermatozoides con energía. La cantidad de azúcar no debe ser menor a 0,5%. Así mismo, un exceso de carbohidratos puede aumentar la osmolaridad por lo que no debe superar el 3% en la composición (Laskutoff, et. al., 2010).

2.5.5.2. Agentes Proteínicos.

Dentro de los principales agentes proteínicos empleados en los diluyentes seminales se encuentran la yema de huevo (YH) y la leche descremada. La yema de huevo (YH) se utiliza ampliamente para la dilución del semen de diferentes especies dado el alto nivel de “factores de protección espermática” que se le atribuyen. Este efecto protector sería debido a la presencia de lipoproteínas, lecitinas y glucosa; lo que permitiría el mantenimiento de la viscosidad del semen, formando un barniz protector alrededor de los espermatozoides y proveyendo de nutrientes a los mismos (Martínez, et. al., 2011). La yema de huevo presenta alto peso molecular y una

baja densidad de la fracción lipoproteica, lo que brinda protección al espermatozoide contra el choque por frío, además reduce la pérdida de enzimas acrosomales y previene cambios degenerativos en el acrosoma durante el almacenamiento líquido del semen ovino (Córdova, et. al., 2008).

Así mismo, la leche de vaca es otro compuesto clásico en la preparación de diluyentes para semen y que para ser empleada debe ser descremada (leche descremada “LD”) y llevada hasta el punto de ebullición por 15 minutos con lo que se inhibe la lactenina presente en la leche y que resulta tóxica para los espermatozoides. Con el proceso de calentamiento, la leche además de contribuir con el componente proteico para el diluyente seminal, promueve el desdoblamiento de la lactosa a glucosa y galactosa, que los espermatozoides pueden utilizar como fuente energética de mayor disponibilidad (De la Vega, 2000). El éxito del uso de la leche de vaca se debe a la fracción proteica (caseína), la cual puede actuar como amortiguador contra los cambios del pH y como agente quelante contra algunos metales pesados. También protege parcialmente al espermatozoide durante la reducción de la temperatura en el almacenamiento (Córdova, et. al., 2008).

En la últimas décadas se ha venido empleando la lecitina de soya en remplazo de la yema de huevo y leche de vaca por permitir mejores niveles de bioseguridad. Este componente está constituido por fosfolípidos (L- α -fosfatidilcolina) y aparentemente no tienen efectos citotóxicos sobre los espermatozoides ni efecto negativo sobre la motilidad espermática, por lo que ha sido utilizado en la crioconservación de semen de bovinos, equinos, porcinos, humanos y particularmente ovinos (Sharafi, et. al. 2009; Del Valle, et. al. 2011).

2.5.5.3. Agentes Tamponadores o reguladores de pH.

La adición de agentes tamponadores a los diluyentes seminales ayuda a controlar el pH del medio. Sin estas sustancias el pH disminuye por acción del metabolismo del espermatozoide formando ácido láctico que es el principal metabolito, reduciendo el pH intracelular y su metabolismo. Entre las

sustancias tamponadoras simples se encuentran el citrato y el bicarbonato de sodio con una capacidad tamponadora limitada; se han empleado sustancias más complejas que pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (TES, HEPES, MOPS y TRIS) (Galina, et. al., 2009; Laskutoff, et. al., 2010)

El TRIS (Tris(hidroxi-metil)-aminometano) fue originalmente utilizado como principal componente de diluyentes para la congelación de semen bovino, entre sus características principales están: poseer una buena capacidad tampón, actividad diurética y osmótica, además de baja toxicidad en altas concentraciones. El uso de Tris en diluyentes para semen ovino fue descrito en algunas investigaciones, en éstas se comprobó que los espermatozoides de carnero toleran una concentración de Tris de hasta 400 mM y que el azúcar mas adecuado como fuente de energía para este tipo de diluyentes es la glucosa (Merino, 2003; Illera, 1994).

2.5.5.4. Agentes Crioprotectores.

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro) alcanzando una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará mas deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor. Los crioprotectores pueden ser penetrantes y no penetrantes. Los primeros son de bajo peso molecular, y permeables a través de la membrana celular (glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH). Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes, los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Ávila , et. al., 2006).

El glicerol es el crioprotector más frecuentemente usado para el congelamiento de semen, la concentración óptima del glicerol está determinada por la composición del diluyente, la velocidad de enfriamiento, el método de congelación y descongelación empleado y la especie animal, siendo este último factor el más determinante. La principal función del glicerol es reducir la concentración de sales y conservar mayor cantidad de agua no congelada, tanto en el interior como en el exterior de la célula a cualquier temperatura. No obstante, el glicerol pese a ser un buen crioprotector, también tiene efectos adversos sobre el espermatozoide durante su adición y en el proceso de congelación y descongelación, viéndose afectada la motilidad pos-descongelación. La velocidad de congelamiento y descongelamiento, y la composición del diluyente interactúan con la concentración del crioprotector, por lo que se hace necesario variar los porcentajes de glicerol según el método de congelación, la que hace que la supervivencia de los espermatozoides depende de la concentración del crioprotector y la velocidad de congelamiento y descongelamiento escogidas (Herrera, et. al., 2012).

2.5.6. Aditivos empleados en los diluyentes ovinos.

Además de la yema de huevo, leche entera descremada y albúmina sérica bovina, principales constituyentes de los diluyentes seminales por décadas, se han empleado sustancias que permiten mejorar las tasas de movilidad e integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides ovinos crioconservados con diluyentes convencionales (Tris + yema de huevo) como surfactantes o detergentes, anticoagulantes, factores de crecimiento y antioxidantes. El surfactante lauril sulfato sódico conocido también como dodecil sulfato ionico (DSI) o dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas (Bittencourt, et. al., 2008; Deneb, et. al., 2012; Morton , et. al., 2010). Su función principal es aumentar la solubilidad de los fosfolípidos permitiendo una mayor disponibilidad que es aprovechada por los espermatozoides. Se ha observado que este detergente posee un efecto benéfico sobre la motilidad e integridad acrosómica

relacionado con su acción sobre la yema de huevo (Stornelli , et. al., 2005); de igual manera mejora los índices de calidad (motilidad progresiva, integridad de las membranas espermáticas), la sobrevivencia, longevidad y fertilidad de los espermatozoides pos-descongelación (Bittencourt, et. al., 2008).

También se ha empleado, como aditivo para los diluyentes seminales, el etileno-diamino-tetra-acetato-disódico (EDTA), cuya acción principal es quelar el calcio en el medio extracelular disminuyendo su influjo hacia el medio intracelular, inhibiendo los efectos deletéreos del calcio sobre los espermatozoides, cuyo nivel intracelular aumenta por efecto de la crioconservación el cual provoca una disfunción y muerte celular. En investigaciones realizadas en la congelación de semen de bovinos y bubalinos se pudo obtener una tasa 10%- 12% mayor de motilidad progresiva de los espermatozoides pos-descongelación al ser adicionado a una concentración de 0,1% de EDTA al diluyente en comparación con el diluyente que no lo contenía (Bittencourt, et. al., 2008).

Los espermatozoides ovinos luego del proceso de congelamiento-descongelamiento presentan una gran proporción de capacitación prematura, que desestabiliza la membrana espermática y reduce el tiempo de sobrevivencia espermática en el tracto reproductivo de la oveja. Aparentemente este efecto se debe a que los espermatozoides son susceptibles a los radicales libres de oxígeno ya que la estructura de su membrana está constituida de ácidos grasos insaturados que tienden a sufrir peroxidación lipídica reduciendo la motilidad progresiva y aumentando la muerte celular (Membrillo, et. al., 2003; Santiani, et. al., 2007). Para evitar este inconveniente el uso de antioxidantes mejoró los protocolos de criopreservación de semen ovino mediante el bloqueo de la desestabilización espermática y así lograr mejores tasa de fertilidad. Algunos reportes indican la utilización de un análogo de la enzima superóxido dismutasa denominado Tempo (2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy) como antioxidante para prevenir la pérdida de la calidad espermática. En dichos trabajos se indican que la adición de Tempo previene parcialmente la pérdida de motilidad y vitalidad, así como reduce la proporción de espermatozoides capacitados prematuramente al impedir la producción de radicales libres de

oxígeno evitando la peroxidación lipídica de sus membranas (Santiani, et. al., 2007). Con resultados similares y basándose en los mismos principios, también se ha empleado como aditivo antioxidante el Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) (Mara , et. al., 2005).

Con el intento de mejorar la motilidad total y progresiva del semen ovino se empleo como aditivo para los diluyentes el Factor de Crecimiento Epidérmico “EGF” (Epidermal Growth Factor) encontrado en el plasma seminal de varias especies mamíferas. Los efectos del EGF son ejercidos directamente sobre sus receptores ubicados en el acrosoma regulando la capacitación y reacción acrosomal. Estudios realizados determinaron que este factor regula la capacitación, las reacciones acrosómicas y la motilidad de los espermatozoides de roedores, bovinos y humanos. Al adicionar EGF a un diluyente a base de TRIS + yema de huevo empleado en el procesamiento de semen ovino, se observó que mejoró significativamente la motilidad de los espermatozoides en comparación con el diluyente que no lo contenía (Spalekova , et. al., 2011).

2.6. Descongelación del semen ovino crioconservado.

En la utilización del semen crioconservado, la fase de descongelamiento es tan importante para la sobrevivencia de los espermatozoides como el proceso de congelamiento, los espermatozoides que sobreviven a temperaturas de -196°C son sometidos al calentamiento y atraviesan nuevamente la zona crítica de -15°C a -60°C (Mazon, 2011). La descongelación de semen es un punto muy crítico pudiendo lesionarse los espermatozoides si el proceso de descongelación no se lleva a cabo de una forma apropiada, aparte de los daños criogénicos causados por la congelación. El semen de carnero se debe descongelar a una temperatura no menor a 37°C en un baño de agua con termómetro por un lapso de 45 a 50 segundos (Evans, et. al., 1990; Illera, 1994). La descongelación del semen a 37°C es más adecuada en condiciones prácticas por excluir el riesgo de súpercalentamiento (Mazon, 2011).

2.7. Valoración del espermatozoide congelado-descongelado.

La fertilidad del semen congelado-descongelado se relaciona con la motilidad, viabilidad, ultra-estructura y cambios bioquímicos del espermatozoide congelado-descongelado. Sin embargo, las pruebas de laboratorio básicas para evaluar el semen criopreservado son la motilidad, viabilidad e integridad de las membranas: plasmática y acrosomal (Galina, et. al., 2009).

2.7.1. Motilidad y viabilidad.

La motilidad es el análisis más simple de realizar, se basa en la visualización de ondas de movimiento espermático observadas al microscopio en un portaobjetos a 37°C luego de descongelar el semen apropiadamente. Para el indicativo de viabilidad de los espermatozoides, el análisis de motilidad se debe realizar a intervalos de una y dos horas después de descongelado el semen en una muestra de 0,5ml incubada a 37°C. Los eyaculados de carnero se consideran adecuados para su conservación y uso en inseminación artificial si el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo no es menor del 40% al descongelarlos y de 30% después de terminado la prueba de viabilidad (Evans, et. al., 1990).

2.7.2. Integridad de las membranas plasmática y acrosomal.

El proceso de congelación-descongelación afecta las membranas: plasmática y acrosomal. La proporción de daño acrosomal varía con el método de congelación sin exceder el 70% (Evans, et. al., 1990). Las pruebas más simples para detectar el daño en las membranas: plasmática y acrosomal, son el test de endosmosis positiva (HOST), que evalúa la integridad de la membrana plasmática, y el test de resistencia osmótica (ORT), que evalúa la integridad del acrosoma (Rubio, 2009).

La prueba endosmótica (Hypoosmotic Swelling Tests. HOST) se basa en la semipermeabilidad de las membranas plasmáticas intactas y bioquímicamente activas de los espermatozoides vivos, las cuales absorben

agua cuando son expuestas a una solución hiposmótica. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. En los espermatozoides funcionalmente alterados no se produce la captación selectiva de agua de forma adecuada alcanzándose así un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que no provoca cambios morfológicos apreciables. En rumiantes, se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L o un poco más elevadas (150 mOsm/L) para evitar la aparición de falsos negativos, producto de la ruptura de la membrana plasmática que fisiológicamente debería estar en condiciones isosmóticas a 300-320 mOsm/L. (Rubio, 2009).

El test de valoración de la funcionalidad acrosomal, es una prueba que permite valorar la integridad del acrosoma al someter los espermatozoides a un medio hipo-osmótico (*Osmotic Resistance Test*, ORT) de forma que aquellos funcionales no mostrarán alteraciones estructurales evidentes a nivel acrosómico. La evaluación del estado de los acrosomas permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados. Al realizar esta prueba se evalúan dos grupos de muestras sometidas a dos diferentes condiciones, una en hiposmosis (150 mOsm/L) y otra en condiciones isosmóticas a 320 mOsm/L que sirve como grupo control al test. Los resultados se reflejan de manera porcentual, luego de sumar los porcentajes de acrosomas intactos en las muestras evaluadas de ambos grupos y dividirlos entre dos, para obtener así un cociente que representa el porcentaje de resistencia acrosomal al medio hipo-osmótico (%ORT) (Rubio, 2009).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. Físicos.

- 1 cobertizo de 24m².
- 1 Vagina artificial para la especie ovina.
- 4 tubos de ensayo de capacidad para 5ml.
- 4 tubos de ensayo capacidad para 15ml.
- 2 vasos de precipitación capacidad para 50ml.
- 1 matraz Erlenmeyer de 250ml.
- 1 termómetro de alcohol de 150°C de capacidad.
- 1 cubierta termo-protectora.
- 1 cámara de Neubauer.
- 1 pipeta para glóbulos rojos.
- 2 pipetas de 1ml de capacidad.
- 1 microscopio óptico 10X, 40X, 60X, 100X.
- 1 estufa hasta 100°C de calefacción regulable.
- 1 baño maría de 5 litros de capacidad.
- 2 cajas de portaobjetos.
- 2 cajas de cubreobjetos.
- 1 paquete por 2500 pajuelas de 0,5ml.
- 1 caja térmica de espuma flex 40cm x 25cm x 30cm.
- 1 contenedor de nitrógeno líquido, capacidad para 20kg.
- 1 computador portátil para procesamiento de datos.

3.1.2. Químicos.

- 100ml de lubricante no espermicida estéril.
- 100ml de solución salina formolada al 4%.

- 200ml de solución hipo-osmótica (150 mOsm) de citrato de sodio.
- 200ml de solución iso-osmótica (300 mOsm) de citrato de sodio.
- 1 frasco de 50ml de tinción de eosina.
- 1 frasco de 50ml de tinción de nigrosina.
- 1 frasco de 200ml de diluyente seminal Andromed®.
- 1 frasco de 240gr de diluyente seminal Triladyl®.
- 1 frasco de 30gr de surfactante Equex®.
- 100gr de alcohol polivinílico.
- 1 galón de agua destilada estéril.
- 16kg de Nitrógeno líquido.

3.1.3. Biológicos.

- 16 eyaculados provenientes de 4 carneros de la raza Pelibuey.
- 2 ovejas de raza criolla estrogenizadas empleadas como maniquí.
- 4 yemas de huevos frescos.
- 3000 m² de pasto raigrás inglés (*Lolium perenne*).

3.2. Métodos.

3.2.1. Ubicación geográfica.

La ubicación del ensayo es el sector Guagal, en la parroquia Tomebamba, a veinte minutos del Cantón Paute, provincia del Azuay en las siguientes coordenadas:

- Altitud: 2380 m.s.n.m.
- Latitud: 02° 45' Sur.
- Longitud: 78° 39' W.

La zona está influenciada por el embalse de la represa Mazar, muestra dos estaciones: una lluviosa y otra seca, presenta un clima cálido con temperaturas que fluctúan entre los 15°C y 20°C.

3.2.2. Diseño estadístico.

El diseño experimental empleado es de bloques al azar (DBA), en donde cada bloque esta representado por un carnero seleccionado como donador, las eyaculaciones son consideradas como unidades experimentales y los diluyentes TRIS + lecitina de soya (Andromed) ® y TRIS + yema de huevo (Triladyl®) solos y en asociación con surfactante lauril sulfato de sodio (Equex STM®) son los tratamientos.

3.2.3. Modelo matemático del diseño

$$X_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

X_{ij}.- Observación cualquiera debido a tratamiento, repetición y efecto del error experimental.

μ.- Media de la población.

T_i.- Efecto que provoca los tratamientos.

B_j.- Efecto que provoca las repeticiones.

ε_{ij}.- Efecto del error experimental.

i.- Tratamiento.

j.- Repeticiones.

3.2.4. Descripción del diseño experimental.

- Tipo de diseño.- Diseño de Bloques al Azar (DBA).
- Tratamientos:
 - o Tratamiento A.- Andromed ®.
 - o Tratamiento B.- Andromed ® + Surfactante Equex STM®.
 - o Tratamiento C.- Triladyl ®.
 - o Tratamiento D.- Triladyl ® + Surfactante Equex STM®.

- Repeticiones: 4.
- Número de U. Experimentales: 16
- Muestras de semen por U. Exp.: 6
- Total de muestras para DBA 96

3.2.5. Caracterización de la unidad de análisis.

Las unidades de análisis estuvieron compuestas por pajuelas de 0,5ml de capacidad cargadas de semen de ovino procesado en los cuatro tratamientos a una concentración de 200 millones de espermatozoides/ml (valor mínimo requerido para la inseminación artificial transcervical según literatura citada) en un total de 96 unidades de dosis inseminantes.

3.2.6. Diluyentes seminales empleados en el experimento.

3.2.6.1. Andromed®.- Es un diluyente seminal sin yema de huevo siendo remplazada por lecitina de soya, evitando el riesgo de contaminación bacteriana y variaciones indeseables en lotes de semen congelado. Contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos. Andromed® ha sido ampliamente empleado en la congelación y refrigeración del semen bovino, sin embargo, también se ha usado exitosamente en especies no bovinas especialmente ovina y caprina.

3.2.6.2. Triladyl®.- Diluyente seminal con yema de huevo. Triladyl® es un buffer que contiene TRIS, Ácido cítrico, azúcar, Glicerina, agua purísima y antibióticos, adecuado para el procesamiento de semen en dilución de 1 paso. Este diluyente se ha establecido como un medio clásico para la producción de semen bovino especialmente, pero también se han podido congelar una serie de eyaculados de otros mamíferos, como

ovinos, caprinos, camélidos y caninos, como igualmente de diversas especies exóticas.

3.2.7. Aditivo aplicado en los diluyentes seminales en el experimento.

3.2.7.1. Equex STM®.- Es una sustancia detergente cuyo principio activo es el dodecil sulfato de sodio (DSS, SDS) también conocido como luril sulfato sódico (SLS) o dodecil sulfato ionico (DSI). La función de este surfactante es aumentar la solubilidad de los fosfolípidos de la yema de huevo, mejorando la disponibilidad y así su capacidad de protección a la membrana plasmática, acrosomas y motilidad de los espermatozoides contra el choque térmico y las alteraciones promovidas por el proceso de crioconservación en varias especies de animales mamíferos (Bittencourt, et. al., 2008; Deneb et. al. 2012).

3.2.8. Raza de los carneros.

La raza de los carneros (*Ovis aries*) que se empleó en el estudio fue la Pelibuey por ser una raza que se está introduciendo ampliamente en nuestro país debido a sus cualidades cárnicas. Se desarrolla satisfactoriamente en climas tropicales. Son animales de conformación cárnica con buenas masas musculares, libre de fibras de lana permanente, cubierto de pelo espeso y corto, de talla media. Los machos pesan entre 85 y 100 kilogramos; las hembras entre 50 y 60 kilogramos. Se distinguen por que son muy rústicos, prolíficos, de una amplia estación reproductiva y sexualmente precoces.

3.2.9. Criterios de selección de los carneros.

La selección de los carneros se realizó de acuerdo a los siguientes parámetros establecidos para el ensayo así:

- De 2 a 4 años de edad.
- Condición corporal de 3 a 4 en escala de 1 a 5.
- Libre de parásitos.
- Simetría testicular.
- Exento de anormalidades físicas.
- Libre de lesiones en prepucio y pene y
- Estado de salud aparentemente sano.

3.2.10. Preparación de los carneros para la recolecta de semen.

La preparación de los machos para que eyaculen en la vagina artificial (VA) empezó 2 semanas antes de la primera colecta de semen para lo cual se empleó ovejas en celo inducido. Éste entrenamiento consistió en el desarrollo y refuerzo de los reflejos condicionados del semental para cubrir una hembra en un cobertizo y en presencia de una persona.

Una vez entrenados los carneros para el procedimiento de recolección del semen, se los aisló por un lapso de 7 días, luego de este tiempo se inicio la recoleta de semen para su procesamiento y análisis.

3.2.11. Criterios de inclusión y exclusión.

3.2.11.1. Criterios de inclusión.- Se incluyeron en la investigación, eyaculados de coloración y consistencia cremosa con calificación 4 y 5 (en escala de 0 a 5), y libre de partículas extrañas.

3.2.11.2. Criterios de exclusión.- No se excluyeron de la investigación ningún eyaculado, sin embargo cabe recalcar que los criterios de exclusión de los eyaculados fueron: eyaculados de coloraciones: cremosa pálida, lechosa, nublosa y claras (calificación de menores o iguales a 3 en escala de 0 a 5), con tonalidades rosáceas, grises. También eyaculados amarillentos diluidos, y con presencia de partículas extrañas.

3.2.12. Procedimientos para la ejecución del experimento.

A los carneros seleccionados se los mantuvo aislados de las ovejas con el fin de evitar montas ocurridas en períodos de tiempo en donde no sean observados. Las muestras destinadas al experimento se tomaron cada 5 días contados a partir de los 7 días posteriores a la finalización del entrenamiento en un total de cuatro repeticiones.

3.2.12.1. Preparación de los diluyentes.- La preparación de los diluyentes se realizó de acuerdo al procedimiento establecido por la casa fabricante tanto para Andromed® como para Triladyl® y la aplicación del Equex STM® según lo planificado para el experimento.

- Preparación de Andromed®.

- Tratamiento A (sin surfactante).- En 1 parte de Andromed® adicionar, poco a poco y agitando, 4 partes de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C.
- Tratamiento B (con surfactante).- En 1 parte de Equex STM® se adicionará 20 partes de Andromed® y a esta mezcla, a su vez, se adicionará 79 partes de agua

destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C.

- **Preparación de Triladyl®.**

- Tratamiento C (sin surfactante).- En 1 Parte de Trilayl® adicionar 3 partes de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C, y esta solución se adicionará a 1 parte de yema de huevo.
- Tratamiento D (con surfactante).- En 1 parte de Equex STM® se adicionará 20 partes de Trilayl®, luego se adicionará 59 partes de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C, y esta solución se adicionará a 20 partes de yema de huevo.

3.2.12.2. Colecta de semen.- El semen se colectó con vagina artificial destinada a la especie ovina y caprina de 15 cm de largo por 5,5cm de diámetro. Además de la vagina artificial se empleó una hembra en celo inducido con benzoato de estradiol.

3.2.12.3. Evaluación del semen fresco.- una vez extraído el semen ovino se procedió a su evaluación antes de la crioconservación bajo los siguientes aspectos:

- Volumen.- medida en tubo graduado de capacidad de 4ml.
- Concentración.- se empleó el método de hemocitometro, para lo cual: 1°) se homogenizó el eyaculado. 2°) se realizó una dilución 1:400 empleando la una pipeta para glóbulos rojos y una solución de formol al 4%. 3°) Se armó la cámara de Neubauer y se deposito, eliminando

las tres primeras gotas, una o dos gotas en los bordes del cubreobjetos que por capilaridad se distribuye el líquido con los espermatozoides por toda la cámara. 4°) Se contó los espermatozoides de cinco cuadros grandes de las cuatro esquinas y el del centro (Anexo N° 3). 5°) luego se procedió a calcular la concentración con la siguiente formula: $Concentración = X \times 5 \times 10 \times 400 \times 1000$ para lo cual X.- número de espermatozoides contados; 5.- valor para obtener el número de espermatozoides en 400 cuadros pequeños; 10.- para obtener la cantidad en 1mm³ ya que la profundidad de la cámara es de 0,10mm; 400.- según la dilución realizada para el conteo; y 1000 para obtener la concentración en mililitros.

- pH.- Medida por método colorimétrico (tornasol). Luego de coleccionar el semen, se procedió a medir el pH en el sobrante de semen una vez vaciado el tubo de recolección.
- Motilidad.- En masa y progresiva observada bajo el microscopio con aumento de 400X y evaluada según su vigor: mínimo 0, máximo 5 de acuerdo al sistema de valoración de la onda de movimiento de Evans y Maxwell (1990).
- Vitalidad.- Fue evaluada en base a la motilidad progresiva después de una y dos horas de incubación a 37°C en baño maría.
- Morfología.- observada en el microscopio con lente de inmersión en frotis de semen teñido con eosina-nigrosina. El procedimiento es colocar sobre un portaobjetos una gota de semen, una gota de eosina y una gota de nigrosina, mezclar con un mondadientes y observar a

1000X. Se contó 100 células, discriminando entre normales y anormales.

- Integridad de las membranas: plasmática y acrosomal.- valoradas por medio de las pruebas HOST y ORT. Para ambas pruebas se incubó una muestra de semen durante 30 minutos en un medio hiposmótico de citrato de sodio (2,7 g/100 mL) a 150 mOsm/L en un baño María a 37°C. Se extrajo una pequeña muestra para realizar la tinción de eosina-nigrosina y se observó con microscopio óptico utilizando el objetivo de inmersión a 1000X de aumento. En el primer caso (HOST) las reacciones positivas al test fueron los flagelos de los espermatozoides enrollados totalmente, enrollados parcialmente, acodados o acodados tenues contados en un total de 150 a 200 células. El resultado final se expresó porcentualmente. Para el segundo caso (ORT) las muestras se dividieron en dos partes incubándose en dos medios distintos, uno hiposmótico (150 mOsm/L) y otro isosmótico (300 mOsm/L) y se cuantificaron las reacciones acrosómicas (acrosomías parciales y pérdidas totales del acrosoma) en cada uno de los dos medios. El resultado final se expresó en porcentaje promedio del resultado de las dos muestras.

3.2.12.4. Procesamiento del semen.- Luego de evaluado el semen fresco (concentración, morfología y motilidad especialmente), y calculado el número de dosis inseminantes, se procedió a realizar la dilución final con el diluyente correspondiente mantenido a la misma temperatura del semen. Luego se disminuyó la temperatura del semen diluido hasta llegar a los 5°C, temperatura en la que se mantuvo por un periodo de una a dos horas para su equilibrio antes de la

congelación. Transcurrido el tiempo de equilibrio se envasó el semen en pajuelas de 0,5ml (Minitüb, Alemania) atemperadas a 5°C y debidamente codificadas y posteriormente congeladas en vapores de nitrógeno líquido (NL) colocadas en una rampa a 4cm de su nivel por 10 minutos seguido del sumergimiento en NL.

3.2.12.5. Evaluación del semen congelado-descongelado.- las muestras de semen evaluadas se descongelaron en baño maría a 35°C por un periodo de 1 minuto a las 72 horas después de haber sido congeladas. Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Motilidad.- En masa y progresiva observada bajo el microscopio en aumento de 10X y 40x, y evaluada según su vigor: mínimo 0, máximo 5 (según Evans y Maxwell, 1990).
- Integridad de las membranas plasmática y acrosomal.- Pruebas: HOST y ORT. Para esta evaluación se empleó la misma metodología empleada en la valoración de semen fresco.

3.2.13. Información levantada.

La información levantada se lo hizo en dos momentos:

3.2.13.1. Primer momento.- Información que se levanto para evaluar el semen fresco y realizar los cálculos necesarios para el número de dosis inseminantes. La información que se levantó fue:

- Volumen de eyaculado.

- Concentración.- número de espermatozoides/ml.
- pH.
- Motilidad.- Vigor de movimiento de los espermatozoides
- Vitalidad.- motilidad a intervalos de una y dos horas.
- Morfología.- Número de células anormales/200 células cuantificadas.
- Integridad de las membranas plasmática y acrosomal.- número de células con endosmosis positiva y acrosoma intacto/200 células evaluadas.

3.2.13.2. Segundo momento.- La información que se levantó en este momento permitió evaluar el semen congelado-descongelado, esta contuvo los siguientes datos:

- Motilidad.- Vigor de movimiento de los espermatozoides evaluados según Evans y Maxwell (1990).
- Integridad de las membranas plasmática y acrosomal.- número de células con endosmosis positiva y acrosoma intacto en 200 células evaluadas.

3.2.14. Análisis estadístico.

El análisis estadístico consistió en una comparación de medias entre grupos mediante análisis de la varianza (ADEVA) y, cuando las diferencias fueron significativas se empleó la prueba de significación de Tukey al 5%. Los resultados se expresaron en media (\bar{X}) \pm desviación típica (s), así como se establecieron los Coeficientes de Variación ($CV=s/\bar{X}$) para los grupos y para las muestras. Los resultados obtenidos se evaluaron empleando el diseño estadístico planteado “DBA” y el análisis de los mismos mediante los paquetes informáticos SPSS versión 19 y Minitab versión 15.

4. RESULTADOS.

4.1. Resultados del Análisis Estadístico de las variables estudiadas en el semen ovino crioconservado.

Los resultados mostrados a continuación se basaron en el análisis estadístico de las variables de estudio del semen de carnero Pelibuey pos-descongelación: Motilidad Progresiva (MP), Integridad de la membrana plasmática (HOST), e integridad de los Acrosomas (HOST, IA).

4.1.1. Análisis estadístico de la Motilidad Progresiva “MP”.

CUADRO N° 1.- Valores medios de la variable “Motilidad Progresiva” obtenidos en el experimento.

REPETICION	TRATAMIENTOS				Σ	\bar{X}
	A	B	C	D		
I	2,6	2,4	2,8	3	10,80	2,70
II	2,8	2,2	2,6	2,4	10,00	2,50
III	2,6	2,2	3,6	3,4	11,80	2,95
IV	3	2,6	2,6	3,6	11,80	2,95
Σ	11,00	9,40	11,60	12,40	44,40	11,10
\bar{X}	2,75	2,35	2,90	3,10	2,78	

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

El cuadro N° 1 muestra que en el tratamiento A la motilidad progresiva observada se ubica entre 2,6 y 3 en la escala de 1 a 5; en el tratamiento B la MP va de 2,2 a 2,6; en el tratamiento C va desde 2,6 a 3,6 y en el tratamiento D la motilidad progresiva esta entre 2,4 y 3,6. La media general obtenida entre tratamientos y repeticiones es de 2,78.

CUADRO N° 2.- Análisis de Varianza de la Motilidad Progresiva.

F. de V.	gl.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig (p)*.
Tratamiento	3	1,21	0,403	3,10 ^{NS}	0,082
Repetición	3	0,57	0,19	1,46 ^{NS}	0,289
Error Exp.	9	1,17	0,13		
Total	15	2,95			

^{NS}.- Denota diferencias no significativas.

C.V: 12,99%

Realizado el análisis estadístico respectivo se establece que no existen diferencias estadísticas tanto para los tratamientos como para las repeticiones, obteniéndose un $p > 0,05$ para los tratamientos ($p=0,082$) y para las repeticiones ($p=0,289$), por lo que se puede manifestar que los cuatro tratamientos aplicados en la congelación de semen ovino generan similares tasas de Motilidad Progresiva. El Coeficiente de Variación de 12,99% indica que la variación observada en las unidades de análisis fue controlada satisfactoriamente. Los resultados obtenidos se ven reflejados en el siguiente gráfico:

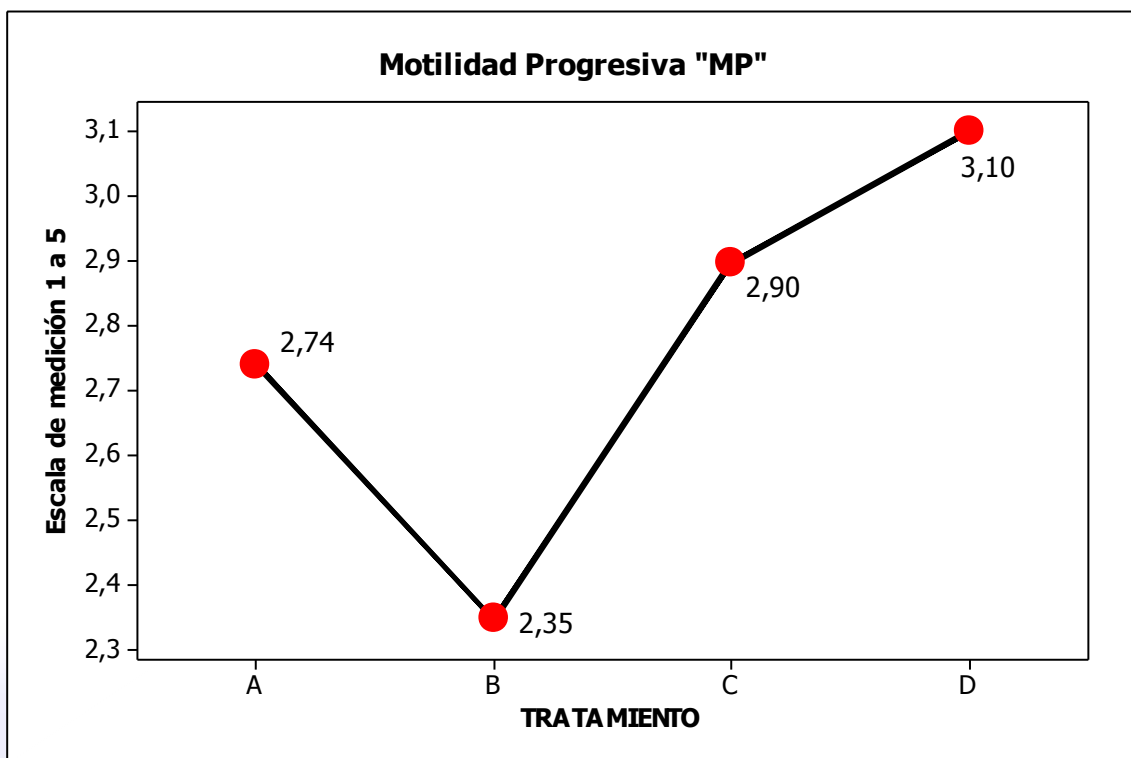


Gráfico N° 1.- Representación lineal de las medias de la variable “Motilidad Progresiva”.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

En el gráfico N° 1 se puede apreciar a simple vista como mejor tratamiento al D “Triladyl® + DSI”, seguido del C “Triladyl® y el A “Andromed®, y como último al B “Andromed® + DSI”. Sin embargo, en el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas por lo que no se pudo aplicar la prueba de significación de Tukey al 5%.

4.1.2. Análisis estadístico de la Integridad de la Membrana Plasmática “HOST”.

CUADRO N° 3.- Valores medios de la variable “HOST” obtenidos en el experimento.

REPETICION	TRATAMIENTOS				Σ	\bar{X}
	A	B	C	D		
I	49,42	39,14	45,74	52,92	187,23	46,81
II	46,46	39,32	44,97	51,04	181,79	45,45
III	41,49	40,74	45,43	52,80	180,46	45,12
IV	37,94	38,32	48,08	50,21	174,54	43,64
Σ	175,32	157,52	184,21	206,97	724,02	181,00
\bar{X}	43,83	39,38	46,05	51,74	45,25	

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI;
Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

El cuadro N° 3 muestra que en el tratamiento A la endosmosis positiva “HOST+” observada se ubica entre 37,94% y 49,42%; en el tratamiento B el valor HOST+ está entre 38,32% y 40,74%; en el tratamiento C va desde 44,97% y 48,09%, y en el tratamiento D la endosmosis positiva está entre 50,21% y 52,92%. La media general obtenida entre tratamientos y repeticiones es de 45,25%.

CUADRO N° 4.- Análisis de Varianza de la Integridad de la Membrana Plasmática “HOST+”.

F. de V.	gl.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig (p)*.
Tratamiento	3	317,04	105,68	13,18	0.001*
Repetición	3	20,35	6,78	0,85	0,503
Error Exp.	9	72,17	8,02		
Total	15	409,55			

*. Denota significancia estadística.

C.V.- 6,26%

Al realizar el ADEVA se denotó diferencias estadísticamente significativas en la variable HOST entre los tratamientos ($p < 0,05$) pero no entre

repeticiones ($p>0,05$) con lo que se comprende que los resultados obtenidos en las repeticiones son homogéneos. El CV de 6,26% indica que la variación ha sido mínima controlada satisfactoriamente con respecto a la variable HOST. En el siguiente gráfico se observa claramente las diferencias encontradas.

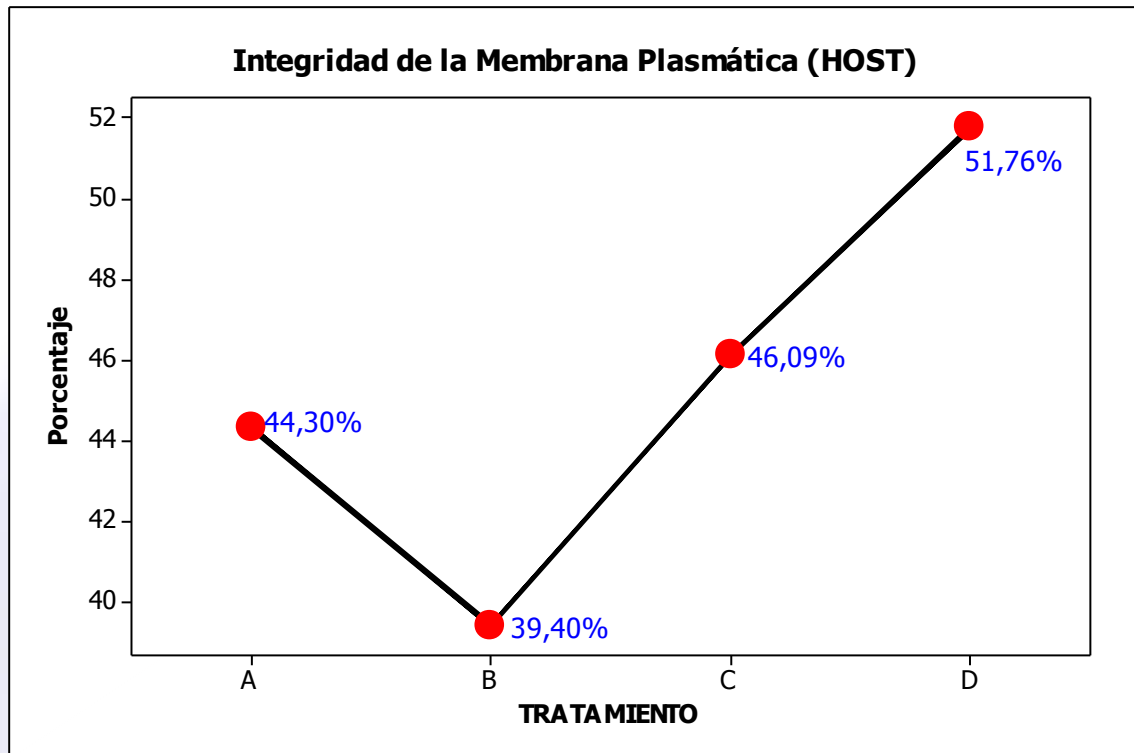


Gráfico N° 2.- Representación lineal de las medias de la variable “HOST”.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

El gráfico N° 2 muestra como mejor tratamiento al D “Triladyl® + DSI”, seguido del C “Triladyl® y el A “Andromed®, y como último al B “Andromed® + DSI”. El análisis estadístico permitió establecer diferencias significativas por lo que se recomendó hacer la prueba de significación establecida (Tukey 5%).

CUADRO N° 5.- Prueba de significación de Tukey al 5% para la variable HOST.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
D	C	5,69	1,96	0,056	-0,139	11,52
	A	7,91*	1,96	0,008	2,08	13,74
	B	12,36*	1,96	0,000	6,53	18,19
C	A	2,22	1,96	0,68	-3,61	8,04
	B	6,67*	1,96	0,024	0,84	12,50
A	B	4,45	1,96	0,16	-1,34	10,28

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

En la prueba de significación de Tukey al 5% se establece que existe diferencias entre los cuatro tratamientos (Andromed®; Andromed® + DSI; Triladyl®; Triladyl® + DSI) sobre la conservación de la membrana plasmática evaluada por el test de endosmosis positiva "HOST+".

CUADRO N° 6.- Resultados de la prueba de Tukey al 5% para HOST.

Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
B	39,38 ^c		
A	43,83 ^c	43,83 ^b	
C		46,05 ^b	46,05 ^a
D			51,74 ^a
Significación.	0,16	0,68	0,06

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

La prueba de Tukey al 5% para la variable HOST establece tres grupos significativos de tratamientos: a, b y c. Grupo a: tratamiento D y C (Triladyl® + DSI y Triladyl®); Grupo b: tratamiento C y A (Triladyl® y Andromed®); y Grupo c: tratamiento A y B (Andromed® y Andromed® + DSI). De todos los

tratamientos el que genera un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática integra es el tratamiento D: “Triladyl® + Equex STM®” (51,74%^a), seguido del tratamiento C “Triladyl®” (46,05%^{ab}), luego sigue el tratamiento A “Andromed®” (43,83%^{bc}) y finalmente, el que conserva menor porcentaje de espermatozoides con membranas plasmáticas integras, el tratamiento B “Andromed® + Equex STM®” (39,38%^c).

4.1.3. Análisis estadístico de la Integridad del Acrosoma “ORT”.

CUADRO N° 7.- Valores medios de la variable “ORT” obtenidos en el experimento.

REPETICION	TRATAMIENTOS				Σ	\bar{X}
	A	B	C	D		
I	42,95	40,64	47,60	52,79	183,98	46,00
II	42,76	39,21	46,25	50,30	178,52	44,63
III	46,53	42,52	44,87	48,54	182,44	45,61
IV	47,65	36,50	45,29	50,76	180,20	45,05
Σ	179,89	158,87	184,00	202,39	725,15	181,29
\bar{X}	44,97	39,72	46,00	50,60	45,32	

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI;
Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

El cuadro N° 7 muestra que en el tratamiento A el test de resistencia osmótica “ORT” observado se ubica entre 42,76% y 47,65%; en el tratamiento B el valor ORT está entre 36,50% y 42,52%; en el tratamiento C va desde 44,87% y 47,60%, y en el tratamiento D la resistencia osmótica está entre 48,54% y 52,79%. La media general obtenida entre tratamientos y repeticiones es de 45,32%.

CUADRO N° 8.- Análisis de Varianza de la resistencia osmótica “ORT”.

F. de V.	gl.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig (p)*.
Tratamiento	3	239,34	79,78	15,25	0,001*
Repetición	3	4,62	1,45	0,28	0,840
Error Exp.	9	47,09	5,23		
Total	15	290,80			

*. Denota significancia estadística.

C.V.- 5,05%

Al realizar el ADEVA se denotó diferencias estadísticamente significativas en la variable ORT entre los tratamientos con un valor de $p < 0,05$ ($p = 0.001$) por lo que se recomendó hacer la prueba de significación establecida (Tukey 5%). El CV de 5,05% indica que la variación ha sido mínima y controlada satisfactoriamente con respecto a la variable ORT. Las diferencias observadas se observan claramente en el siguiente gráfico.

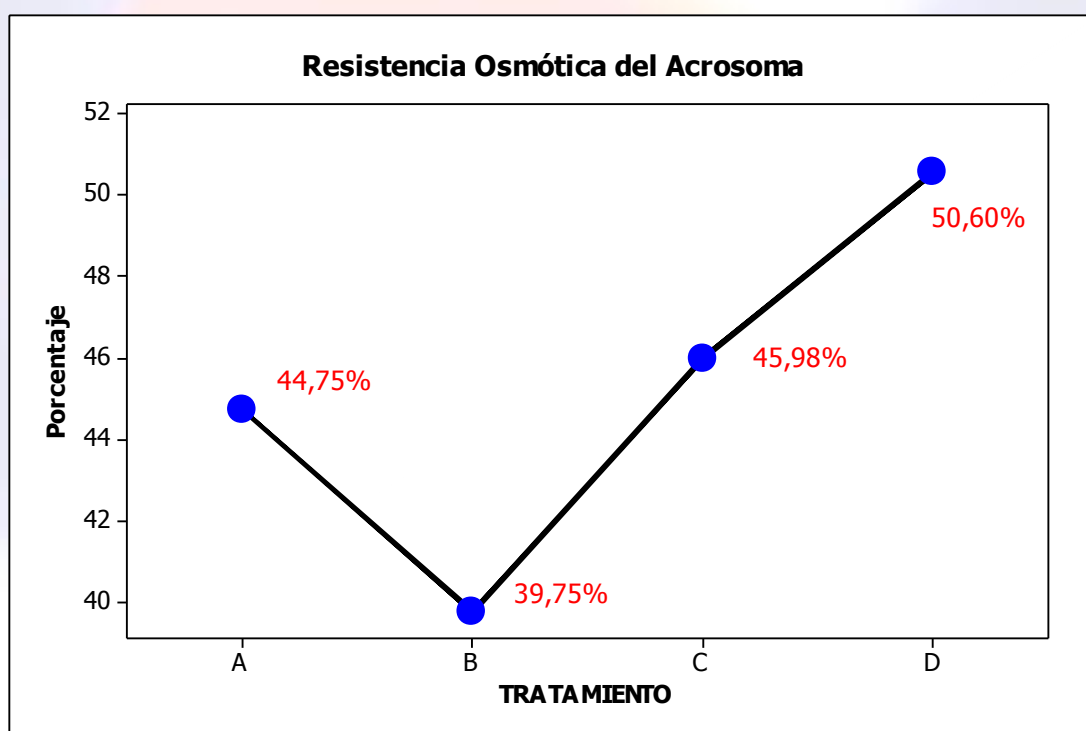


Gráfico N° 3.- Representación lineal de las medias de la variable “ORT”.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

El gráfico N° 3 muestra como mejor tratamiento para la conservación de la membrana acrosomal al D “Triladyl® + DSI”, seguido del C “Triladyl® y el A “Andromed®, y como último al B “Andromed® + DSI”. El análisis estadístico permitió establecer diferencias significativas por lo que se recomendó hacer la prueba de significación establecida (Tukey 5%).

CUADRO N° 9.- Prueba de significación de Tukey al 5% para la variable ORT.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
D	C	4,60*	1,46	0,037	0,25	8,94
	A	5,63*	1,46	0,01	1,28	9,97
	B	10,88*	1,46	0,000	6,53	15,23
C	A	1,03	1,46	0,89	-3,32	5,38
	B	6,29*	1,46	0,005	1,94	10,63
A	B	5,26*	1,46	0,017	0,91	0,60

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

En la prueba de significación de Tukey al 5% se establece que existe diferencias entre el Andromed® y Triladyl® y sus combinaciones con el surfactante Equex STM® sobre la conservación de la integridad de la membrana acrosomal.

CUADRO N° 10.- Resultados de la prueba de Tukey al 5% para ORT.

Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
B	39,72 ^c		
A		44,97 ^b	
C		46,00 ^b	
D			50,60 ^a
Significación.	1.00	0.89	1.000

Tratamiento A.- Andromed®; Tratamiento B.- Andromed® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

La prueba de Tukey al 5% para la variable ORT establece tres grupos significativos de tratamientos: a, b y c. Grupo a: tratamiento D (Triladyl® + DSI); Grupo b: tratamiento C y A (Triladyl® y Andromed®); y Grupo c: miento B (Andromed® + DSI). De todos los tratamientos el que genera un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana acrosómica integra es el tratamiento D “Triladyl® + Equex STM®” (50,60%^a), seguido del tratamiento C “Triladyl®” (46,00%^b) y tratamiento A “Andromed®” (44,97%^b) y finalmente, el que conserva menor porcentaje de espermatozoides con membranas acrosómicas integras, el tratamiento B “Andromed® + Equex STM®” (39,72%^c).

4.1.4. Análisis estadístico de los acrosomas intactos “AI”.

CUADRO N° 11.- Valores medios de la variable Acrosomas Intactos “AI” obtenidos en el experimento.

REPETICION	TRATAMIENTOS				Σ	\bar{X}
	A	B	C	D		
I	54,38	50,88	36,83	48,99	191,08	47,77
II	44,65	42,89	40,06	47,40	175,00	43,75
III	42,35	36,22	37,78	49,00	165,35	41,34
IV	44,02	37,54	46,19	48,52	176,28	44,07
Σ	185,40	167,53	160,86	193,91	707,71	176,93
\bar{X}	46,35	41,88	40,22	48,48	44,23	

Tratamiento A.- Andromed®; Tratamiento B.- Andromed® + DSI;
Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

El cuadro N° 11 muestra que en el tratamiento A la tasa de acrosomas intactos AI se ubica entre 42,35% y 54,38%; en el tratamiento B el valor AI está entre 36,22% y 50,88%; en el tratamiento C va desde 36,83% y 46,19%, y en el tratamiento D la tasa de acrosomas intactos está entre 47,40% y 49,00%. La media general obtenida entre tratamientos y repeticiones es de 44,23%.

CUADRO N° 12.- Análisis de Varianza de los Acrosomas Intactos “AI”.

F. de V.	gl.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig (p)*.
Tratamiento	3	176,63	58,88	2,76 ^{NS}	0,104
Repeticón	3	84,64	28,21	1,32 ^{NS}	0,326
Error Exp.	9	191,84	21,32		
Total	15	453,11			

^{NS}. - Denota No Significativo.

C.V.- 10,44%

Al realizar el ADEVA no se encontró diferencias estadísticamente significativas en la tasa de Acrosomas Intactos “AI” entre los tratamientos y repeticiones con un valor de $p > 0,05$ para ambos casos ($p = 0,104$, $p = 0,326$ respectivamente) por lo no se recomendó hacer la prueba de significación

establecida (Tukey 5%). El CV de 10,44% indica que la variación ha sido mínima y controlada satisfactoriamente con respecto a la variable AI. En el gráfico siguiente se observa lo expuesto anteriormente.

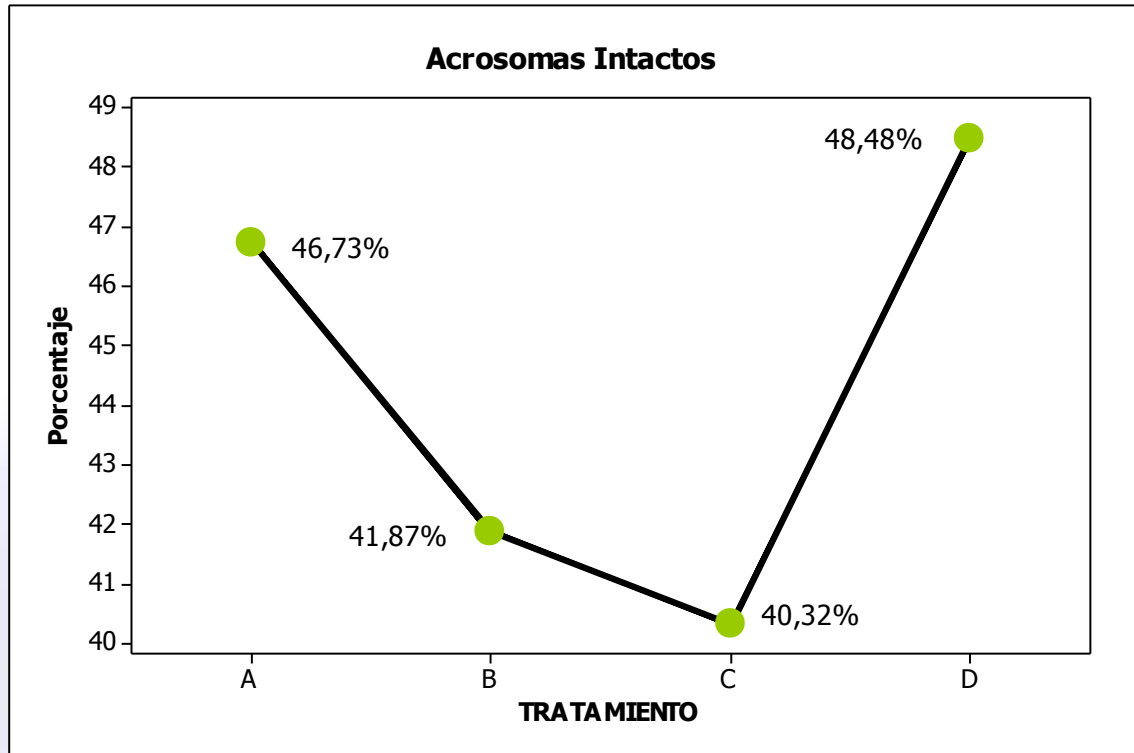


Gráfico N° 4.- Representación lineal de las medias de la variable “Acrosomas intactos”.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

En el gráfico N° 4 se puede apreciar como mejor tratamiento en la conservación de acrosomas intactos luego de la descongelación del semen crioconservado al tratamiento D “Triladyl® + DSI”, seguido del A “Andromed® y el B “Andromed® + DSI” y como último al C “Triladyl®. Sin embargo, en el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos por lo que no se pudo aplicar la prueba de significación de Tukey al 5%.

5. DISCUSIONES

En la investigación se estudio la eficacia protectora en la crioconservación de semen ovino de los diluyentes: Tris+ yema de huevo, Tris + yema de huevo + surfactante, Tris + lecitina de soya y Tris +lecitina de soya + surfactante; medida a través de la motilidad espermática progresiva y la presencia de las membranas plasmática y acrosomal intactas de los espermatozoides ovinos congelados. Para el análisis del semen congelado se tomaron seis muestras por cada tratamiento y repetición, y se descongelaron en baño María a 37°C por 30 segundos y posteriormente fueron sometidas a la evaluación respectiva.

Los resultados obtenidos (Cuadro N° 13) permitieron demostrar el efecto benéfico del surfactante Docecil Sulfato Iónico (DSI, SDS, DSS) al ser adicionado al diluyente TRIS + yema de huevo; así también se demostró la similitud entre resultados de los diluyentes TRIS + yema de huevo y TRIS + lecitina de soya; sin embargo, no se pudo demostrar la hipótesis planteada para esta investigación de que la adición del surfactante Dodecil Sulfato Iónico a un diluyente sintético a base TRIS y lecitina de soya aumenta la motilidad espermática progresiva y un mayor número de espermatozoides con membranas plasmática y acrosomal íntegras en el semen ovino de raza Pelibuey crioconservado, en proporción mayor que la aplicación del diluyente convencional TRIS + yema de huevo.

CUADRO N° 13 Resultados del Análisis de varianza de los parámetros de evaluación seminal pos-congelación en el experimento.

Tratamientos	Variables		
	MP (0-5)	HOS (%)	ORT (%)
A	2,75 ±0,19 ^{NS}	43,83±5,11 ^{bc}	44,97±2,49 ^b
B	2,35±0,19 ^{NS}	39,38±1,01 ^c	39,72±2,54 ^c
C	2,90±0,48 ^{NS}	46,05±1,39 ^{ab}	46,00±1,21 ^b
D	3,10±0,53 ^{NS}	51,74±1,34 ^a	50,60±1,75 ^a
a, b, c.- Letras diferentes en un misma columna indican diferencia estadística. NS.- indica no significativo.			

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

La motilidad espermática se valoró por observación directa al microscopio óptico con el lente de 400x basándose en una escala de 0 a 5, en donde los mejores resultados se vieron en el diluyente TRIS + yema de huevo + surfactante (1%), aunque no se encontraron diferencias estadísticas pos-descongelación sobre este parámetro, con una motilidad de $3,10 \pm 0,53$ equivalente a un valor $>40,00\%$ según Evans, et. al. (1990), estos resultados son similares a los encontrados por *da Silva Maia et. al.*, (2008), al emplear el sistema computarizado de evaluación espermática asistida o CASA, determinando una motilidad en masa de $69,9 \pm 5\%$ y una motilidad progresiva de $39,1 \pm 3,6\%$ en espermatozoides congelados con TRIS + yema de huevo + surfactante; y son superiores a los generados por *Deneb et. al.* (2012), mediante la valoración de los espermatozoides con movimiento observados bajo el microscopio óptico a 100X, estableciendo una motilidad progresiva de $36,05 \pm 0,86\%$ al emplear surfactante en una concentración de 0,5% en un diluyente a base de TRIS + yema de huevo.

La integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides congelados fue evaluada mediante el test de endosmosis positiva o HOST en todos los diluyentes empleados siendo el diluyentes a base de TRIS + yema de

huevo + surfactante el que mejor eficiencia protectora mostró ($p < 0,05$), obteniéndose valores de $51,74 \pm 1,34\%$, superior a los obtenidos por *Deneb et.al.* (2012) con $37,31 \pm 1,27\%$, quienes consideraron como espermatozoides con membrana plasmática intacta a los que reaccionaron a la tinción supravital de eosina-nigrosina; de igual manera son diferentes a los obtenidos por *da Silva Maia et. al.*, (2008), al emplear la técnica de fluorescencia utilizando fluorocromos (Iodato de propidio "IP" y diacetado de carboxifluoresceína "DIC") mostrando una integridad de la membrana plasmática de $32,40 \pm 2,3\%$ en espermatozoides crioconservados en medios TRIS + yema de huevo + surfactante 1% en carneros de raza Santa Inés.

La integridad del acrosoma se valoró mediante el test de resistencia osmótica u ORT y observada al microscopio con lente de inmersión (1000x) luego de realizar un frotis y teñido con eosina-nigrosina, se valoraron como acrosomas intactos a los espermatozoides que tenían el borde apical normal. Los datos obtenidos muestran una integridad del acrosoma mayor en el diluyente TRIS + yema de huevo + surfactante ($p < 0,05$) con $50,60 \pm 1,75\%$, estos resultados son inferiores a los obtenidos por *Deneb et.al.* (2012) que emplearon para evaluar el acrosoma la solución de fijación de glutaraldehído al 2% en cocadilato de sodio mostrando tasas de integridad acrosomal de $81,82 \pm 1,72\%$; sin embargo son superiores a los de *da Silva Maia et. al.* (2008) que obtuvieron $40,00 \pm 4,5\%$ empleando la técnica fluorescente de clortetraciclina.

Los resultados obtenidos en los diluyentes TRIS + yema de huevo (Triladyl®) y TRIS + lecitina de soya (Andromed®) fueron estadísticamente similares entre sí ($p > 0,05$) y demostraron igualdad en la eficiencia crioprotectora. La motilidad espermática obtenida fue de $2,90 \pm 0,48$ para Triladyl® y de $2,75 \pm 0,19$ para Andromed®, equivalentes a un porcentaje mayor a 30,00% según *Evans et. al.* (1990). Estos valores demostraron inferioridad a los obtenidos por *Sharafi et. al.* (2009) con una motilidad de $52,6 \pm 3,9\%$ para el diluyente TRIS + lecitina de soya evaluados mediante observación directa en microscopio óptico. Los resultados son similares a los obtenidos por *Hernández et. al.* (2012) con $37,4 \pm 5,3\%$ de espermatozoides con motilidad progresiva para el diluyente TRIS + yema de huevo empleando para la valoración la

técnica de observación bajo el microscopio con aumento de 100x y escala de 0 a 100. No obstante, son superiores a los obtenidos por *da Silva Maia et. al.* (2008) que obtuvieron un $34,3 \pm 2,5\%$ en motilidad total y $24,4 \pm 1,9\%$ de motilidad progresiva evaluados mediante el sistema CASA empleando para la congelación de semen ovino un diluyente a base de TRIS + Yema de huevo.

La integridad de la membrana plasmática obtenida con el diluyente Andromed® fue de $43,83 \pm 5,11\%$ y para Triladyl® fue de $46,05 \pm 1,39\%$ mediante la prueba de endosmosis, estos datos son inferiores a los obtenidos por *Sharafi et. al.* (2009) quien empleo un diluyente a base de TRIS + lecitina de soya al 1% con una integridad de $49,1 \pm 3,4\%$ utilizando la prueba de endosmosis positiva HOST. En cuanto a la protección sobre la membrana plasmática generada por el diluyente TRIS + yema de huevo, los datos son similares a los obtenidos por *Cabrera et. al.* (2011), quienes emplearon un diluyente a base de TRIS y yema de huevo de codorniz al 15% (*Coturnix coturnix*) estableciendo una integridad de la membrana espermática de $41,27 \pm 4,5\%$ en carneros de razas de pelo (Black belly, Pelibuey y Assaf) recurriendo para su evaluación al test HOST; así mismo son superiores a los obtenidos por *da Silva Maia* (2008) cuyo valor sobre la integridad de la membrana plasmática fue de $13,8 \pm 2,3\%$ evaluados mediante la técnica de tinción con clortetraciclina fluorescente.

El estado del acrosoma fue evaluado mediante el test de resistencia osmótica ORT y mostró una integridad de $44,97 \pm 2,49\%$ para Andromed®, y $46,00 \pm 1,21\%$ para Triladyl®, resultados inferiores a los obtenidos por *Hernández et. al.* (2012) que obtuvieron $54,6 \pm 7,15\%$ de acrosomas no reaccionados (íntegros) al emplear el diluyente TRIS + yema de huevo (Triladyl®) en la crioconservación de semen de carnero de la raza Suffolk empleando los fluorocromos para su evaluación, también fueron inferiores a los obtenidos por *Deneb et. al.* (2012) quienes obtuvieron $69,99 \pm 1,72\%$ acrosomas normales evaluados mediante la solución de fijación de Glutaraldehído 2% en cocadilato de sodio en espermatozoides de carneros de raza de pelo congelados con TRIS + yema de huevo. Los resultados obtenidos en la evaluación del acrosoma de los espermatozoides congelados en el

diluyente a base de TRIS + lecitina de soya (Andromed®) son inferiores a los obtenidos por *Sharafi et. al.*, que obtuvieron una tasa de integridad del acrosoma (acrosomas no reaccionados) de $72,2 \pm 1,9\%$ empleando la técnica de fluorescencia con clortetraciclina (CTC).

Los resultados obtenidos para el diluyente TRIS + lecitina de soya + surfactante 1% son inferiores a los obtenidos en los demás medios, siendo la motilidad progresiva de $2,35 \pm 0,19$, una integridad de la membrana plasmática de $39,38 \pm 1,01\%$ y una tasa de acrosomas intactos de $39,72 \pm 2,54\%$. Al no obtener literatura actualizada sobre el uso del surfactante lauril sulfato de sodio en un medio a base de TRIS + lecitina de soya (Andromed®) en la congelación de semen de carnero, no se pudo contrastar los datos obtenidos; sin embargo, se pudo apreciar que su empleo en la crionconservación de semen ovino de raza Pelibuey, en este trabajo, no mejora la protección brindada por los demás diluyentes (TRIS + yema de huevo + surfactante; TRIS + yema de huevo; y TRIS + lecitina de soya) por lo que no debería emplearse en la conservación criogénica de éste material genético.

Cabe recalcar que las deformidades tanto del acrosoma como de la cola del espermatozoide pudieron influir en los resultados obtenidos en el test Host y el test ORT al no ser tipificados al inicio del experimento; sin embargo, todas las observaciones de evaluación de las muestras fueron realizadas por la misma persona, sujetándose a sufrir los mismos errores de lectura. Por tal razón los coeficientes de variación, al estar dentro de los rangos permitidos, indican que el experimento fue conducido adecuadamente. No obstante, las diferencias entre: los resultados obtenidos en esta investigación y los de otros autores, pueden deberse a las técnicas de evaluación empleadas y factores inherentes a la individualidad de los animales, raza y edad.

6. CONCLUSIONES

La combinación del surfactante lauril sulfato de sodio con el diluyente TRIS + lecitina de soya (Andromed®), no mostró eficacia crioprotectora superior a la obtenida por los diluyentes: TRIS + yema de huevo + surfactante; TRIS + yema de huevo; y TRIS + lecitina de soya, en la congelación de semen ovino de raza Pelibuey por lo que, de acuerdo a esta investigación, no debería emplearse en la congelación de éste material genético al promover bajas tasas de motilidad espermática, integridad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma (MP $2,35 \pm 0,19$; HOST $39,38 \pm 1,01\%$; ORT $39,72 \pm 2,54\%$).

El surfactante lauril sulfato de sodio (SDS) permitió obtener una mejor calidad del semen congelado al ser adicionado al 1% al diluyente TRIS + yema de huevo (Triladyl®) siendo el medio de primera elección para la crioconservación de semen ovino de raza Pelibuey (MP $3,10 \pm 0,53$; HOST $51,74 \pm 1,34\%$; ORT $50,60 \pm 1,75\%$) considerando el riesgo de contaminación bacteriana y la variación entre lotes generados por el componente de origen animal.

Luego del diluyente seminal TRIS + yema de huevo + surfactante, considerado estadísticamente como primera elección, los diluyentes TRIS + lecitina de soya y TRIS + yema de huevo son considerados como segunda opción para congelar semen de ovino por generar similares tasas de calidad espermática entre sí y ligeramente inferiores a la obtenida por el diluyente de primera elección en la crioconservación de semen ovino (Motilidad $2,75 \pm 0,19$ vs $2,90 \pm 0,48$, $p > 0,05$; Integridad de la membrana $43,83 \pm 5,11\%$ vs $46,05 \pm 1,39\%$, $p > 0,05$; Integridad del acrosoma $44,97 \pm 2,49\%$ vs $46,00 \pm 1,21\%$, $p > 0,05$) con la ventaja de que el diluyente TRIS + lecitina de soya reduce el riesgo de contaminación bacteriana y variaciones indeseables en la crioconservación, lo que es difícil de obtener con el diluyente TRIS + yema de huevo.

La motilidad progresiva por si sola no determina la calidad del semen crioconservado, conclusión establecida por no existir diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos según los tratamientos empleados (A: $2,75 \pm 0,19$; B: $2,35 \pm 0,19$; C: $2,90 \pm 0,48$; D: $3,10 \pm 0,53$; $p > 0,05$), por lo que se requiere de otros aspectos como el grado de conservación de la integridad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma permitiendo estimar de mejor manera la calidad seminal pos-descongelación.

7. RECOMENDACIONES

La tendencia actual en la fabricación de diluyentes seminales está encaminada a remplazar los componentes de origen animal (yema de huevo) por componentes sintéticos (lecitina de soya). La remoción de la yema de huevo en la preparación de los diluyentes seminales elimina del riesgo por contaminación bacteriana e influencia de drogas y hormonas, así como también la prevención de variaciones indeseables en el procesamiento de semen. En vista de lo mencionado anteriormente y en conjunto con los resultados obtenidos, se recomienda que en la crioconservación de semen ovino se emplee los diluyentes sintéticos como el TRIS + lecitina de soya, que aunque en esta investigación no fue el mejor diluyente en conservar la motilidad espermática e integridad de las membranas plasmática y acrosomal, se ajusta a las exigencias vigentes. Pese a los resultados obtenidos, las tendencias actuales de bioseguridad en la preparación de diluyentes destinados a la crioconservación seminal, invitan a que se continúe la investigación empleando diferentes diluyentes sintéticos libres de componentes de origen animal con o sin asociación a surfactantes sobre la eficacia crioprotectora del semen de otras razas de ovinos.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Arenas, Edith; Cambrón, Ángel; Ambríz, Demetrio; Zúñiga, Pedro; Rodríguez, Ahiezer; Rosado, Adolfo. 2010.** Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide . [En línea] 2010. [Citado el: 01 de Marzo de 2013.]
<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/fisiologica.pdf>.
2. **Arthur, Geoffrey H., Noakes, David E. y Pearson, Harold. 1991.** *Reproduccion y Obstetricia en Veterinaria (Teriogenología)*. Madrid : McGraw-Hill Interamericana, 1991. ISBN: 84-7615-747-9.
3. **Ashrafi, I; Kohram, H ; Naijian, H; Bahreini, M ; Mirzak, H. 2011.** Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. [En línea] 2011. [Citado el: 1 de Abril de 2012.] ISSN 1756-0500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185483>.
4. **Ávila, Luz Mabel; Madero, José; López, Claudia; León, María Fernanda; Acosta, Lucía; Gómez, Claudia; Delgado, Lucy Gabriela; Gómez, Claudio; Lozano, José Manuel; Reguero, María T. 2006.** Fundamentos de Crioconservación. [En línea] Diciembre de 2006. [Citado el: 18 de Enero de 2012.] <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/1952/195214318008.pdf>. ISSN: 0034-7434.
5. **Barbas , JP y Mascarenhas, RD. 2009.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. [En línea] 2009. [Citado el: 28 de Marzo de 2012.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=seminal%20extender%20ovine>. PMID: 18548333 .
6. **Bittencourt, Rodrigo F.; Riveiro, Antonio de Lisboa; Lima, Marcos Ch. C.; Alves, Sidney G.G.; Vasconcelos, Martha F.; Biscarde, Carmo E.;**

- Leal, Luciana da Silva; Oba, Eunice. 2008.** Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. [En línea] 2008. [Citado el: 2 de abril de 2012.] http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?pid=S1413-95962008000400008&script=sci_arttext. ISSN 1413-9596.
7. **Boerke, Arjan, Brouwers, Jos F.; Olkkonen, Vesa M.; Van de Lest, Chris H.A.; Sostaric, Edita; Schoevers, Eric J.; Helms, Bernd; Gadella, Barend M.. 2012.** Involvement of Bicarbonate-Induced Radical Signaling in Oxysterol Formation and Sterol Depletion of Capacitating Mammalian Sperm During In Vitro Fertilization. [En línea] 2012. [Citado el: 10 de Marzo de 2013.] <http://www.biolreprod.org/content/88/1/21.full.pdf+html>.
8. **Cabrera, Próspero, Orellana, Javier y Pantoja, César. 2010.** Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. [En línea] 2010. [Citado el: 31 de Marzo de 2012.] http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172010000200002&script=sci_arttext. ISSN 1609-9117.
9. **Camara, D R y Guerra, MMP. 2011.** Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. [En línea] 2011. [Citado el: 22 de Marzo de 2012.] <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n1/pag33-40.pdf>.
10. **Chávez, Samantha; Chávez, Desiderio; Montoya, Gabriel; Vergara, Zaira. 2008.** El efecto del medio M-199 y Sperm-talp sobre la capacitación espermática y fertilización de ovocitos de bovino madurados in vitro. [En línea] 2008. [Citado el: 12 de Marzo de 2013.] XIX Semana nacional de la investigación científica. [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/pdf/investigacion/avances2008/Veterinaria/MedicinaVeterinaria\(pp433-504\)/ChavezRomoSamantha\(pp451-456\)/451-456.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/pdf/investigacion/avances2008/Veterinaria/MedicinaVeterinaria(pp433-504)/ChavezRomoSamantha(pp451-456)/451-456.pdf). ISSN: 978-607-00-2083-4.

11. **Choez, Katherine. 2010.** Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. [En línea] 2010. [Citado el: 8 de Marzo de 2013.] http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/files/Articulo_choez_aguilar.pdf.
12. **Córdova , Alejandro. 2008.** Bienestar y Reproducción Animal. [En línea] 2008. [Citado el: 08 de Marzo de 2013.] <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208/121216.pdf>. ISSN: 1695-7504.
13. **Córdova, A; Córdova, M.; Córdova, C.; Guerra, J. 2008.** Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. [En línea] 2008. [Citado el: 27 de Febrero de 2013.] http://www.produccionovina.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/20-Cordova-Procedimientos.pdf.
14. **da Silva, Marciane; Dimas, Sony; Costa, Hymerson; Bartoli, Daniel; Rodello, Leandro; Meira, Cezinande. 2008.** Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (oep) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. [En línea] 2008. [Citado el: 23 de junio de 2012.] <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/482>. ISSN: 0102-5716.
15. **De la Vega, A. C. 2000.** Procesamiento de semen caprino para inseminación artificial: Revision. [En línea] 2000. [Citado el: 28 de Febrero de 2013.] <http://aiza.org.ar/doc/0005.pdf>. ISSN 1515 3037.
16. **Del Río, María José; Godoy, Ana; Toro, Alejandra; Orellana, René; Cortés, Manuel E.; Moreno, Ricardo D.; Vigil, Pilar. 2007.** La reacción Acrosómica del espermatozoides: Avances Recientes. [En línea] 2007. [Citado el: 26 de Febrero de 2013.] <http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/262/262v5n4a13115521pdf001.pdf>.

17. **Del Valle, I; Gómez-Durán, A; Holt, WV; Muiño-Blanco, T; Cebrián-Pérez, JA. 2011.** Soy Lecithin Interferes with Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. [En línea] 2011. [Citado el: 31 de Marzo de 2012.]
<http://www.andrologyjournal.org/cgi/rapidpdf/jandrol.111.014944v1>. PMID: 22134371 .
18. **Deneb, Paul; Cob, Leandro; Rivera, Juan; Domínguez, Álvaro; Baeza, Juan; Ramón, Julio. 2012.** Efecto de la adición de un surfactante (Orvus es paste®) en el diluyente de congelación sobre la calidad y la capacidad fecundante del semen ovino de pelo (Ovis aries) congelado. [En línea] 2012. [Citado el: 9 de Marzo de 2013.]
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/36698/1/Articulo-7.pdf>. ISSN: 0798-2259.
19. **Evans, Gareth y Maxwell, WMC. 1990.** *Inseminacion artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza : ACRIBIA, 1990. ISBN: 84-200-0675-0.
20. **Fukui, Yutaka; Kohno, Hirohide; Togari, Tetsuro; Hiwasa, Mami; Okabe, Kentaro. 2008.** Fertility after Artificial Insemination Using a Soybean-Based Semen Extender in Sheep. [En línea] 2008. [Citado el: 31 de Marzo de 2012.] http://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/54/4/54_286/_article. ISSN : 1348-4400.
21. **Gadea, J. 2003.** Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Revisión. [En línea] Spanish Journal of Agricultural Research, 2003. [Citado el: 3 de Junio de 2012.] <http://www.agrodigital.com/upload/gadea%20sjar2003-espa%C3%B1ol.pdf>.
22. **Galina, Carlos y Valencia, Javier. 2009.** *Reproduccion de Animales Domésticos*. México : Limusa S.A. , 2009. ISBN: 978-968-18-7132-1.
23. **Grasa, Patricia; Colas, Carmen; Gallego, Margarita; Monteagudo, Luís; Muiño, Teresa; Cebrian, José. 2009.** Changes in content and localization

of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. [En línea] 2009. [Citado el: 08 de Marzo de 2013.] <http://www.reproduction-online.org/content/137/4/655.long>. doi:10.1530/REP-08-0280 .

24. **Guerrero, Hernán; Huanca, Wilfrido; Raymundo, Fernando; Huerta, Sandra; Ramos, Daphne. 2009.** Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. [En línea] 2009. [Citado el: 10 de Marzo de 2013.] http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172009000100007. ISSN 1609-9117 .
25. **Hafez, E.S.E. y Hafez, B. 2004.** *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Mexico : McGraw-Hill Inteamericana, 2004. ISBN: 0-683-30577-8.
26. **Hernández, P. J.E.; Fernández, R.F.; Rodríguez, S. J.L.; Juárez, R. E. ; Soto, M. Y.G. ; García, R. A.D.. 2012.** Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. [En línea] 2012. [Citado el: 15 de Marzo de 2013.] <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v34n2/rsa03212.pdf>.
27. **Herrera, E, Castro, L y Chacón , J. 2012.** Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino. [En línea] 2012. [Citado el: 15 de Marzo de 2013.] <http://revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/4681>. ISSN Impreso: 0250-5649.
28. **Hidalgo, Carlos, Tamargo, Carolina y Díez, Carmen. 2005.** Análisis del semen bovino. [En línea] 2005. [Citado el: 27 de Febrero de 2013.] <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=1495>. ISSN: 1135-6030.
29. **Hintz, Harold; Legates, James; Loosli, Jhon; Maynard, Leonard; Sorenses, A. M.; Warner, Richard; Warwick, Everett. 1987.** *Ganadería: Guía para la reproducción, nutrición. cría y mejora del ganado*. Primera. México : McGraw-Hill, 1987. pág. 286. Vol. I. ISBN: 968-422-268-8.

30. **Holt, WV y North , RD. 1994.** Effects of Temperature and Restoration of Osmotic Equilibrium during Thawing on the Induction of Plasma Membrane Damage in Cryopreserved Ram Spermatozoa'. [En línea] 1994. [Citado el: 28 de Marzo de 2012.] <http://www.biolreprod.org/content/51/3/414.long>. PMID: 7803613 .
31. **Illera, Mariano. 1994.** *Reproducción de los animales domésticos*. Madrid : AEDOS, 1994. ISBN: 84-7003-339-5.
32. **Laing, J. A., Brinley, W. J. y Wagner, W. C. 1990.** *Fertilidad e Infertilidad en la práctica veterinaria* . México : LIMUSA, S. A., 1990. ISBN: 968-18-0319-1.
33. **Laskutoff, Naida M; Rohr, Jennifer; Lomneth, Richard B.; Wood, David G.; Crichton, Elizabeth 2010.** *Semen Extender Composition and Methods for Manufacturing and Using* . US 7,674,576 B2 United States, 09 de Marzo de 2010.
34. **Latorre, Etel y Sales, Francisco. 2000.** *Retajos en Producción Ovina*. 2000. ISSN: 0717-4829.
35. **López, A; Regueiro, M; Castrillejos, A; Pérez, R.. 2011.** Morfología espermática en carneros: efectos del plano nutricional y de la época del año. [En línea] 2011. [Citado el: 2 de Marzo de 2013.] http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/171-espermatoca_15.pdf.
36. **Mara , L; Accardo , C; Pilichi , S ; Dattena , M; Chessa, F; Chessa , B ; Branca , A ; Cappai , P . 2005.** Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. [En línea] 2005. [Citado el: 2 de Abril de 2012.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826687>. PMID: 15826687.
37. **Martínez, Josefa; Duverger, O; Díaz, Namibia; Interian, L.; González, Dianelys. 2011.** Efecto de diferentes niveles de yema de huevo en la congelación del semen caprino en un medio liofilizado a base de Tris. [En

línea] 2011. [Citado el: 10 de Marzo de 2013.]

http://bva.fao.cu/pub_doc/CIMAGT/CIMAGT%20Vol%205,%20No%201%202011/Fefa.Niveles%20de%20Yema.pdf..

38. **Mayren, Félix; Vergara, Marcela; Juárez, María; Toledano , Ángel; Rosales, Ana María; Ávalos, Alejandro. 2012.** Participación de enzimas translocasas en la reacción acrosomal del espermatozoide del conejo. [En línea] 2012. [Citado el: 7 de Marzo de 2013.]
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010112/011210.pdf>. ISSN 1695-7504.
39. **Mazon, Eduardo. 2011.** *Sêmen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos*. Brazil : Universidad Federal de Goiás, 2011.
40. **Melling, M y Alder, M. 2000.** *Práctica ovina y caprina*. Buenos Aires. : Intermédica, 2000. ISBN: 950-555-230-0.
41. **Membrillo, Agustín; Córdova, Alejandro; Hicks, Juan; Olivares, Ivonne; Martinez, Victor; Valencia, Javier. 2003.** Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. [En línea] 2003. [Citado el: 28 de Febrero de 2013.]
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/339/33908704.pdf>. ISSN: 0378-1874.
42. **Méndez, Guadalupe; Jaramillo, Gerardo; Aragón, Andrés; Ayala , María Elena; Domínguez, Ignacio. 2009.** Función reproductiva de sementales ovinos importados de Nueva Zelanda durante su primera época reproductiva en México. [En línea] 2009. [Citado el: 28 de Febrero de 2013.]
<http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol40-02/RVM040000202.pdf>.
43. **Merino, Ricardo A. 2003.** Estudios preliminares en capacitacion in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados. [En línea] 2003. [Citado el: 28 de Febrero de 2013.]
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvm562e/doc/fvm562e.pdf>.

44. **Morton , KM, Evans , G y Maxwell, WM. 2010.** Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. [En línea] 2010. [Citado el: 1 de Abril de 2012.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416935>. PMID: 20416935 .
45. **Muñoz, Camila. 2001.** *Curso Avances en producción ovina*. 2001. ISSN: 0717-4810.
46. **Rodríguez, Felipe; Ávila, Carlos; Anchondo, Alfredo; Sánchez, Blanca; Jiménez, Jorge. 2008.** Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. [En línea] 2008. [Citado el: 27 de Febrero de 2013.] http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400002. ISSN 1405-3195.
47. **Rubio, Jorge L. 2009.** Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. [En línea] Agosto de 2009. [Citado el: 19 de Enero de 2012.] <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95911613010>. ISSN: 0798-2259.
48. **Rubio, Jorge y Quintero, Armando. 2008.** Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. [En línea] 2008. [Citado el: 1 de Marzo de 2013.] http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_50.pdf.
49. **Santiani, A; Ruiz, F.; Sandoval, R.; Evangelista, S; Urbiola, M.; Catacora, N; Coronado , L.; Delgado , A.. 2007.** Incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen. [En línea] 2007. [Citado el: 30 de Marzo de 2012.] http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/19-Santiani.pdf.

50. **Sharafi, Mohsen; Forouzanfar, Mohsen ; Morteza, Sayed ; Hajian, Mehdi ; Ostadhosseini, Somaye ; Hosseini, Laleh ; Abedi, Parvaneh ; Nili, Nafiseh ; Rahmani, Hamid Reza ; Javaheri, Ahmad ; Nasr, Mohammad Hossein; 2009.** In Vitro Comparison of Soybean Lecithin Based-Extender with Commercially Available Extender for Ram Semen Cryopreservation. [En línea] 2009. [Citado el: 18 de Marzo de 2013.] http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/107320090307.pdf.
51. **Spalekova , Eliska, Makarevich , Alexander V. y Lukac, Norbert . 2011.** Ram Sperm Motility Parameters under The Influence of Epidermal Growth Factor. [En línea] 2011. [Citado el: 4 de Abril de 2012.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3103862/?tool=pubmed>. PMID: 21647340 .
52. **Stornelli , MC; Tittarelli , CM ; Savignone, CA ; Stornelli, MA; 2005.** Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. [En línea] 2005. [Citado el: 25 de Enero de 2012.] http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/103_stornelli_criopreservacion.pdf. ISSN 1514259-0.
53. **Urrego, Rodrigo; Ríos, Andrea; Olivera, Martha; Camargo, Omar; 2008.** Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. [En línea] 2008. [Citado el: 10 de Marzo de 2013.] http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902008000100003&script=sci_arttext&tlng=es. ISSN 0120-0690.
54. **Vera, Nelsón Matías. 2009.** Caracterización de la función sexual de carneros de la raza highlander y suffolk. [En línea] 2009. [Citado el: 10 de Marzo de 2013.] Tesis. http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2009/vera_n/doc/vera_n.pdf.



ANEXOS

ANEXO N° 1.

























Sistema de valoración visual de la concentración espermática, consistencia y onda de movimiento del semen de carnero (Evans, et. al., 1990; Hafez, et. al., 2004; Melling, et. al., 2000).

Puntuación y Calificación		Consistencia	Descripción*	Número de espermatozoides ($n \times 10^9$)	
				Media	Rango
5	Muy buena	Cremoso espeso	Denso, ondas de movimiento muy rápidas. No se puede observar las células individuales. El 90% o más de los espermatozoides son activos.	5,0	4,5-6
4	Buena	Cremoso	Movimiento vigoroso, pero las ondas y los remolinos no son rápidos como los de valor 5. Alrededor de 70 a 85% de células activas.	4,0	3,5- 4,5
3	Regular	Cremoso liviano o diluido	Sólo aparecen ondas de movimiento lento. Se pueden ver espermatozoides aislados. El 45 a 65% de las células son activas.	3,0	2,5-3,5
2	Pobre	Lechoso	No aparecen ondas. Existe algún movimiento de espermatozoides. 20 a 40% están vivos pero su movilidad es pobre.	2,0	1,0-2,5
1	Muy pobre	Nublado o brumoso	Muy pocos espermatozoides muestran signos de vida (10%) y con movimientos débiles.	0,7	0,3-1,0
0	Muertos	Acuoso claro o transparente	Ningún espermatozoide presenta movimiento.	Insignificante	

* Observadas al microscopio.

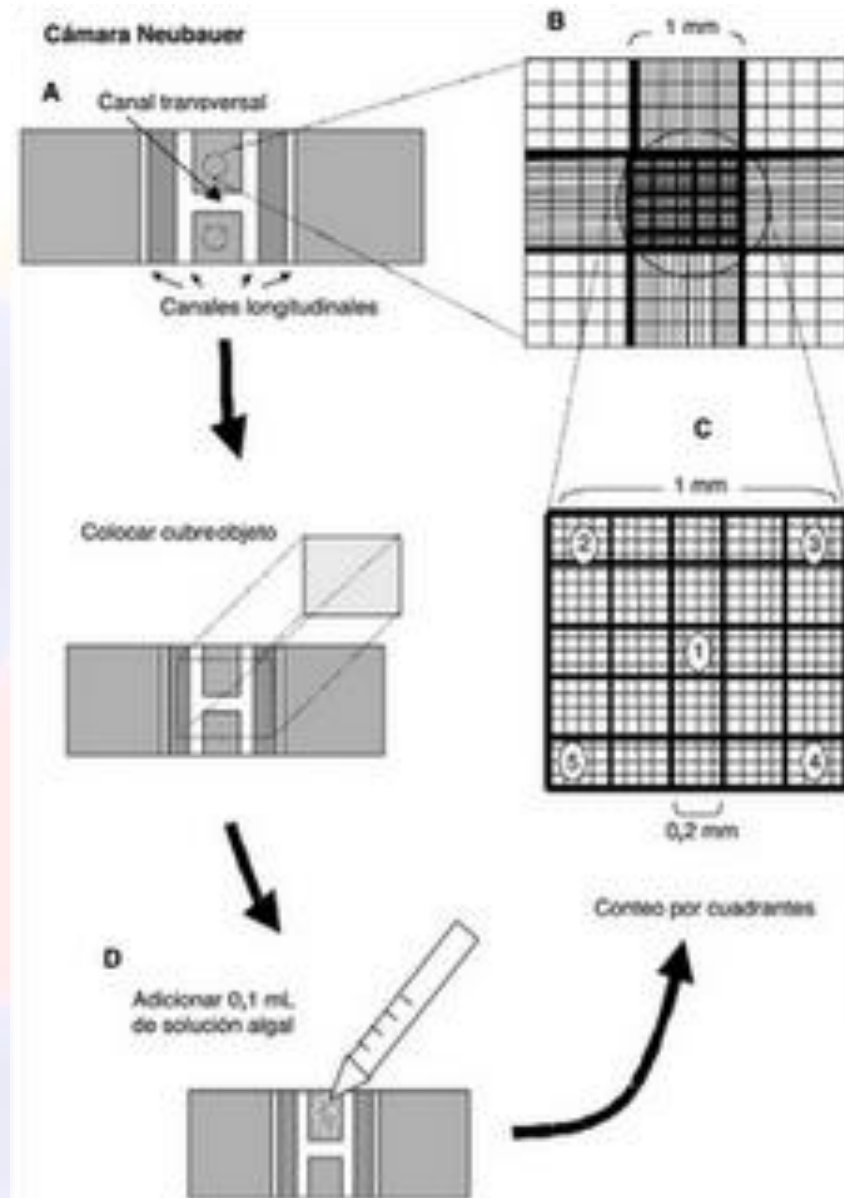
ANEXO N° 2.

Alteraciones morfológicas de los espermatozoides de acuerdo a la región: Acrosoma, Cabeza, Pieza intermedia y Cola.

Acrosoma	 normal	 pequeño	 disuelto	 deformado	 torcido		
Cabeza	 normal	 microcéfalo	 macrocéfalo	 angosta	 deformada	 piriforme	
Pieza intermedia	 normal	 paraxial	 retroaxial	 deformada	 fibrilar	 gota citoplasmática	
Cola	 normal	 rudimentaria	 doble	 doble con dos cabezas	 moño	 retorcida	 retroaxial con gota


ANEXO N° 3.

Estructura de la cámara de Neubauer empleada para el conteo de espermatozoides.



ANEXO N° 4.

Ficha de registro de la evaluación del semen ovino.

		UNIVERSIDAD DE CUENCA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS MESTRIA EN REPRODUCCION ANIMAL	
FICHA DE REGISTRO DE LA EVALUACION ESPERMÁTICA DE LOS CARNEROS REPRODUCTORES DESTINADOS A INSEMINACION ARTIFICIAL.			
1. Datos Informativos			
Fecha: _____	N° Animal: _____		
Edad: _____	Origen: _____		
N° de Colecta: _____	Hora de colecta: _____		
2. Información semen fresco.			
2.1. Evaluación macroscópica.			
Volumen: _____	Color: _____		
Consistencia: _____	pH: _____		
2.2. Evaluación microscópica.			
Motilidad progresiva: _____	Concentración: _____		
Morfología: _____	HOST _____	ORT: _____	
Vitalidad: MP 1 H: _____	MP 2H: _____		
Acrosomas intactos: _____			
3. Procesamiento de semen.			
Concent. dosis inseminante: _____	N° pajuelas 0,25ml: _____		
Diluyente: _____	ml de diluyente: _____		
4. Evaluación de semen congelado.			
Motilidad progresiva: _____	HOST _____	ORT: _____	
Acrosomas intactos: _____			

ANEXO N°5.
Esquema del diseño.

		TRATAMIENTO			
		B	A	C	D
REPETICIONES	Macho 4	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.
	Macho 2	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.
	Macho 1	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.
	Macho 3	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.	Unid. Exp.

TRATAMIENTO A.- Andromed®

TRATAMIENTO B.- Andromed® + Equex®

TRATAMIENTO C.- Triladyl®

TRATAMIENTO D.- Triladyl® + Equex®

ANEXO N° 6.

Resultados de las muestras de semen fresco obtenidos de los carneros seleccionados para el experimento por tratamiento.

Anexo 6.1. Tratamiento A “Andromed®”.

Anexo 6.1.1. Parámetros valorados de las muestras de semen fresco de los carneros en el tratamiento A (Andromed®).

Rep.	EVALUACION SEMINAL									
	VE (ml)	pH	MP (%)	C	MN (%)	HOST (%)	ORT (%)	VITALIDAD		AI (%)
								MP 1H	MP 2H	
I	1	7	80	5,4	90,00	85,4	78,24	4	3	89,43
II	1	7	90	5,8	90,00	71,2	90,98	4	2	90,68
III	0,8	6,7	90	6,4	87,00	78,3	96,60	3	3	92,95
IV	0,7	6,8	90	5,52	87,00	72,3	93,20	4	3	90,34
Σ	3,5	27,5	350	23,12	354,00	307,2	359,02	15	11	363,40
X̄	0,88	6,88	87,50	5,78	88,50	76,80	89,76	3,75	2,75	90,85
S	0,15	0,15	5,00	0,45	1,73	6,53	8,02	0,50	0,50	1,50
CV (%)	17,14	2,18	5,71	7,72	1,96	8,50	8,93	13,33	18,18	1,65

VE= Volumen de eyaculado; **MP**= Motilidad progresiva; **C**= concentración ($n \times 10^9$ espermatozoides/ml; **MN**= Morfología normal; **HOST**= Test de endosmosis; **ORT**= Test de resistencia osmótica; **MP 1H**= motilidad progresiva a la 1 hora pos incubación a 37°C; **MP 2H**= motilidad progresiva a las 2 horas pos incubación a 37°C; **AI**= Acrosomas intactos.

Los valores medios de las muestras de semen fresco de los eyaculados de los carneros en el Tratamiento A (Andromed®) presentaron un volumen de $0,87 \pm 0,15$ ml; pH $6,87 \pm 0,15$; motilidad progresiva $87,5 \pm 5\%$; concentración espermática $5,78 \pm 0,44 \times 10^9$ spz/ml; Morfología normal de $88,5 \pm 1,7\%$; HOST $76,8 \pm 6,5\%$; ORT $89,8 \pm 8\%$; Acrosomas intactos $90,8 \pm 1,5\%$.

Los Coeficientes de Variación (CV) indican que la variabilidad entre las muestras fue controlada obteniéndose valores inferiores al 20% en las variables sujetas a observación como la vitalidad espermática (13,33% y 18,18%) y volumen (17,14%); así mismo se observan CV inferiores al 10% en las variables sujetas a procesos de laboratorio como pH (2,18%), motilidad

progresiva (5,71%), concentración (7,72%), morfología normal (1,96%), Host (8,5%), ORT (8,93%) y acrosomas intactos (1,65%).

Anexo 6.2. Tratamiento B “Andromed® + Surfactante”

Anexo 6.2.1. Parámetros valorados de las muestras de semen fresco de los carneros en el tratamiento B (Andromed® + DSI).

Rep.	EVALUACION SEMINAL									
	VE (ml)	pH	MP (%)	C	MN (%)	HOST (%)	ORT (%)	VITALIDAD		AI (%)
								MP 1H	MP 2H	
I	1,2	6,9	90,00	5,3	90,00	83,10	95,61	3	2	89,63
II	1	6,7	90,00	5,0	85,00	79,90	88,28	4	3	91,63
III	1	6,5	90,00	5,7	90,00	77,50	96,47	4	3	90,73
IV	0,7	7,1	95,00	5,8	95,00	80,40	96,44	4	3	89,58
Σ	3,9	27,2	365,00	21,8	360,00	320,90	376,80	15	11	361,58
\bar{X}	0,98	6,80	91,25	5,45	90,00	80,23	94,20	3,75	2,75	90,39
S	0,21	0,26	2,50	0,38	4,08	2,30	3,97	0,50	0,50	0,98
CV (%)	21,14	3,80	2,74	6,92	4,54	2,86	4,21	13,33	18,18	1,08

VE= Volumen de eyaculado; **MP=** Motilidad progresiva; **C=** concentración ($n \times 10^9$ espermatozoides/ml; **MN=** Morfología normal; **HOST=** Test de endosmosis; **ORT=** Test de resistencia osmótica; **MP 1H=** motilidad progresiva a la 1 hora pos incubación a 37°C; **MP 2H=** motilidad progresiva a las 2 horas pos incubación a 37°C; **AI=** Acrosomas intactos.

Los valores medios de las muestras de semen fresco de los eyaculados de los carneros en el Tratamiento B (Andromed® + Equex STM®) presentaron un volumen de $0,98 \pm 0,21$ ml; pH $6,80 \pm 0,26$; motilidad progresiva $91,25 \pm 2,5\%$; concentración espermática $5,45 \pm 0,38 \times 10^9$ spz/ml; Morfología normal de $90,0 \pm 4,08\%$; HOST $80,23 \pm 2,3\%$; ORT $94,20 \pm 3,97\%$; Acrosomas intactos $90,39 \pm 0,98\%$.

Los Coeficientes de Variación (CV) indican que variabilidad generada entre las muestras fue mínima obteniéndose valores inferiores al 10% en las variables sujetas a procesos de laboratorio como pH (3,80%), motilidad progresiva (2,74%), concentración (6,92%), morfología normal (4,54%), Host (2,86%), ORT (4,21%) y acrosomas intactos (1,08%). Así mismo existe un CV

menor al 20% en la variable sujeta a observación como la vitalidad espermática (13,33% y 18,18%). Sin embargo el volumen muestra un CV (21,14%) mayor al 20% pudiendo deberse a factores como temperatura y presión de la vagina artificial o por efecto de la estimulación sexual del macho al momento de la toma de la muestra.

Anexo 6.3. Tratamiento C “Triladyl®”.

Anexo 6.3.1. Parámetros valorados de las muestras de semen fresco de los carneros en el tratamiento C (Trilady®).

Rep.	EVALUACION SEMINAL									
	VE (ml)	pH	MP (%)	C	MN (%)	HOST (%)	ORT (%)	VITALIDAD		AI (%)
								MP 1H	MP 2H	
I	0,8	6,9	90,00	5,60	85,00	72,51	87,45	4	3	89,89
II	0,8	6,9	85,00	5,00	85,00	78,44	91,86	4	3	90,06
III	0,6	7	90,00	5,08	86,00	70,17	83,94	3	3	91,28
IV	0,6	7,2	95,00	4,88	88,00	77,70	88,58	4	2	89,88
Σ	2,8	28	360,00	20,56	344,00	298,82	351,83	15	11	361,11
\bar{X}	0,70	7,00	90,00	5,14	86,00	74,71	87,96	3,75	2,75	90,28
S	0,12	0,14	4,08	0,32	1,41	4,01	3,27	0,50	0,50	0,68
CV (%)	16,50	2,02	4,54	6,18	1,64	5,37	3,71	13,33	18,18	0,75

VE= Volumen de eyaculado; **MP**= Motilidad progresiva; **C**= concentración ($n \times 10^9$ espermatozoides/ml; **MN**= Morfología normal; **HOST**= Test de endosmosis; **ORT**= Test de resistencia osmótica; **MP 1H**= motilidad progresiva a la 1 hora pos incubación a 37°C; **MP 2H**= motilidad progresiva a las 2 horas pos incubación a 37°C; **AI**= Acrosomas intactos.

Los valores medios de las muestras de semen fresco de los eyaculados de los carneros en el Tratamiento C (Triladyl®) presentaron un volumen de 0,70 \pm 0,12ml; pH media de 7,00 \pm 0,14; motilidad progresiva 90,0 \pm 4,08%; concentración espermática 5,14 \pm 0,32 $\times 10^9$ spz/ml; Morfología normal de 86,0 \pm 1,40%; test de endosmosis positiva 74,71 \pm 4,01%; test de resistencia osmótica 87,96 \pm 3,27%; Acrosomas intactos 90,28 \pm 0,75%.

Los Coeficientes de Variación (CV) indican poca variabilidad entre las muestras obteniéndose valores inferiores al 20% en las variables sujetas a

observación como la vitalidad espermática (13,33% y 18,18%) y volumen (16,50%); así mismo se observan CV inferiores al 10% en las variables sujetas a procesos de laboratorio como pH (2,02%), motilidad progresiva (4,54%), concentración (6,18%), morfología normal (1,64%), Host (5,37%), ORT (3,71%) y acrosomas intactos (0,75%).

Anexo 6.4. Tratamiento C “Triladyl® + Surfactante”.

Anexo 6.4.1. Parámetros valorados de las muestras de semen fresco de los carneros en el tratamiento D (Trilady® + DSI).

Rep.	EVALUACION SEMINAL									
	VE (ml)	pH	MP (%)	C	MN (%)	HOST (%)	ORT (%)	VITALIDAD		AI (%)
								MP 1H	MP 2H	
I	1,0	7,20	90,00	5,52	87,00	79,35	96,04	3	2	90,81
II	0,7	7,10	90,00	5,12	85,00	73,43	92,09	3	3	90,16
III	0,8	6,60	85,00	5,44	88,00	76,00	92,53	4	3	89,82
IV	0,7	7,00	90,00	5,12	86,00	79,95	88,38	4	3	89,68
Σ	3,2	27,90	355,00	21,2	346,00	308,73	369,04	14	11	360,46
\bar{X}	0,80	6,98	88,75	5,30	86,50	77,18	92,26	3,50	2,75	90,12
S	0,14	0,26	2,50	0,21	1,29	3,05	3,13	0,58	0,50	0,50
CV (%)	17,68	3,77	2,82	3,97	1,49	3,95	3,40	16,50	18,18	0,56

VE= Volumen de eyaculado; **MP**= Motilidad progresiva; **C**= concentración ($n \times 10^9$ espermatozoides/ml; **MN**= Morfología normal; **HOST**= Test de endosmosis; **ORT**= Test de resistencia osmótica; **MP 1H**= motilidad progresiva a la 1 hora pos incubación a 37°C; **MP 2H**= motilidad progresiva a las 2 horas pos incubación a 37°C; **AI**= Acrosomas intactos.

Los valores medios de las muestras de semen fresco de los eyaculados de los carneros en el Tratamiento D (Triladyl® + Equex STM®) presentaron un volumen de $0,80 \pm 0,14$ ml; pH media de $6,98 \pm 0,26$; motilidad progresiva $88,75 \pm 2,5\%$; concentración espermática $5,3 \pm 0,21 \times 10^9$ spz/ml; Morfología normal de $86,5 \pm 1,29\%$; test de endosmosis positiva $77,18 \pm 3,05\%$; test de resistencia osmótica $92,3 \pm 3,13\%$; Acrosomas intactos $90,12 \pm 0,5\%$.

Los Coeficientes de Variación (CV) indican que la variabilidad entre las muestras seleccionadas fue controlada obteniéndose valores inferiores al 20% en las variables sujetas a observación como la vitalidad espermática (16,50% y 18,18%) y volumen (17,68%); así mismo se observan CV inferiores al 10% en las variables sujetas a procesos de laboratorio como pH (3,77%), motilidad progresiva (1,49%), concentración (3,97%), morfología normal (1,49%), Host (3,95%), ORT (3,40%) y acrosomas intactos (0,56%).

ANEXO N° 7.
Esquema del ADEVA del DBA.

F de V	Gl	SC	CM	F. Cal.
Total	rt -1 15	$\frac{\sum X^2 ij}{rt} - FC$		
Tratamientos	t-1 3	$\frac{\sum X^2 i}{r} - FC$	$\frac{SC_{Trat}}{gl_{Trat}}$	$\frac{CM_{Trat.}}{CME. Exp.}$
Repeticiones	r-1 3	$\frac{\sum X^2 j}{t} - FC$	$\frac{SC_{Rep}}{gl_{Rep}}$	$\frac{CM_{Rep.}}{CME. Exp.}$
Error Experimental	(t-1)(r-1) 9	$SCT - SCTr - SCr$	$\frac{SC E. Exp.}{gl E. Exp.}$	

$$FC = \frac{(\sum xij)^2}{rt}$$

$$CV = \frac{\sqrt{CME. Exp.}}{\bar{X}} \times 100$$

ANEXO N° 8.

Evaluación estadística de las muestras de semen fresco.

En el siguiente cuadro se describen los parámetros seminales de las 16 muestras obtenidas en el experimento agrupadas por repetición (carnero).

Anexo 8.1. Evaluación de los valores seminales promedios obtenidos en el experimento por carnero en semen fresco.

Carneros	VE (ml)	MP (%)	C	MN (%)	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
I	1,00±0,16	87,50±5,00	5,45±0,14	88,00±2,45	80,09±5,64	89,34±8,39	89,94±0,61
II	0,88±0,15	88,75±2,50	5,23±0,38	86,25±2,50	75,74±4,10	90,80±1,75	90,63±0,72
III	0,80±0,16	88,75±2,50	5,66±0,56	87,75±1,71	75,49±3,67	92,39±5,95	91,20±1,31
IV	0,68±0,05	92,50±2,89	5,33±0,41	89,00±4,08	77,59±3,72	91,65±3,89	89,87±0,34

VE= volumen de eyaculado; **MP**= motilidad progresiva; **C**= concentración (mil millones de espermatozoides por ml); **MN**= morfología normal; **HOST**= porcentaje de endosmosis positiva; **ORT**= test de resistencia osmótica; **AI**= porcentaje de acrosomas intactos.

El Anexo 8.1. muestra los valores medios más representativos de las características del semen fresco de los 16 eyaculados obtenidos de los 4 carneros empleados en el experimento, se observa que el volumen del eyaculado oscila entre 0,68 ±0,05ml y 1,00 ±0,16ml; la motilidad progresiva fluctúa de 87,5% ±5% y 92,5% ±2,89%; concentración entre 5,23 ±0,38 x 10⁹ y 5,66 ±0,56 x 10⁹ espermatozoides/ml; morfología normal entre 89,0 ±4,08% y 86,25 ±2,5%; Host entre 75,50 ±3,67% y 80,10 ±5,64%; ORT entre 89,34 ±8,4% y 92,40 ±6%; y acrosomas intactos entre 89,94 ±0,61% y 91,2 ±1,3%.

ANEXO N° 9.

Análisis del Coeficiente de Variación (CV) de las variables analizadas en el semen fresco.

Anexo 9.1. Coeficientes de variación de la evaluación del semen fresco de los cuatro carneros.

Carneros	VE (%)	MP (%)	C (%)	MN (%)	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
I	16,33	5,71	2,57	2,78	7,04	9,39	0,68
II	17,14	2,82	7,35	2,90	5,42	1,93	0,79
III	20,41	2,82	9,87	1,95	4,87	6,43	1,44
IV	7,41	3,12	7,69	4,59	4,79	4,25	0,38

VE= volumen de eyaculado; **MP**= motilidad progresiva; **C**= concentración (millones de espermatozoides por ml); **MN**= morfología normal; **HOST**= porcentaje de endosmosis positiva; **ORT**= test de resistencia osmótica; **AI**= acrosomas intactos.

El coeficiente de variación (CV) en el volumen de semen de los carneros en las 16 eyaculaciones indica homogeneidad al no superar el 24% de variación establecido para toma de muestras en el campo; el mayor índice de variabilidad se muestra en el carnero N° III (CV =20,41%), pudiendo deberse a la calidad de estimulación sexual que recibió en el momento de la recolecta pero no influenció en la calidad del semen (motilidad, vitalidad, concentración).

Los CV obtenidos en la motilidad progresiva, concentración, morfología normal, Host, ORT y acrosomas intactos no superan el 12% de variación establecido para procesos de laboratorio por lo que se puede manifestar, en forma general, que tanto las condiciones en las que se obtuvo las muestras seminales así como las condiciones en las que se realizó el análisis del semen en el laboratorio, fueron controladas satisfactoriamente.

ANEXO N° 10.

Análisis del estimado de p de las variables analizadas en el semen fresco.

Anexo 10.1. Valores p obtenidos del análisis de varianza (ADEVA) de la evaluación del semen fresco de los cuatro carneros en los diferentes tratamientos.

Parámetro	Estimado de p	
	Tratamientos	Repeticiones
Motilidad progresiva	0,486	0,259
Concentración	0,120	0,372
Morfología	0,151	0,499
Host	0,389	0,444
ORT	0,450	0,880
Motilidad progresiva luego de 1 hora	0,880	0,522
Motilidad progresiva luego de 2 horas	1,000	0,631
Acrosomas intactos	0,685	0,182

En el análisis de varianza de los parámetros estudiados en la evaluación del semen fresco se observa que no hay diferencia estadística tanto para la distribución entre repeticiones como para los tratamientos, obteniéndose valores del estimado de $p > 0,05$. En referencia a estos valores se observa que las muestras seminales destinadas para el experimento fueron similares, sin que pueda influir directamente el factor inherente a las características seminales de los carneros y la distribución dentro de los tratamientos en los resultados posteriores a la congelación.

ANEXO N° 11.

Resultados obtenidos por tratamiento del semen congelado.

Anexo 11.1. Tratamiento A “Andromed®”.

Anexo 11.1.1. Parámetros valorados de las muestras de semen congelado de los carneros en el tratamiento A (Andromed®).

TRAT	REP.	MP	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
ANDROMED	I	2,6	49,42	42,95	54,38
	II	2,8	46,46	42,76	44,65
	III	2,6	41,49	46,53	42,35
	IV	3	37,94	47,65	44,02
Σ		11,00	175,32	179,89	185,40
\bar{X}		2,75	43,83	44,97	46,35
S		0,19	5,11	2,49	5,44
CV (%)		6,96	11,66	5,53	11,74

TRAT=Tratamiento; **REP**= Repetición; **MP**= Motilidad progresiva; **HOST** = Test de endosmosis; **ORT**= Test de resistencia osmótica; **AI**= Acrosomas intactos.

Los valores medios obtenidos en el protocolo de congelación de semen en el tratamiento A (Andromed®) en las cuatro repeticiones generaron una motilidad progresiva de $2,75 \pm 0,19$; HOST de $43,83 \pm 5,11\%$; ORT $44,97 \pm 2,49\%$ y acrosomas intactos de $46,35 \pm 5,44\%$.

Los Coeficientes de Variación de las muestras de semen congelado en este tratamiento (CV) se ubican por debajo del 12% en lo que respecta a las variables: motilidad progresiva (6,96%), HOST (11,66%), ORT (5,53%) y acrosomas intactos (11,74%); lo que nos indican que las pajuelas a analizar fueron homogéneas para todas las variables.

Anexo 11.2. Tratamiento B “Andromed® + DSI”

Anexo 11.2.1. Parámetros valorados de las muestras de semen congelado de los carneros en el tratamiento B (Andromed® + DSI).

TRAT	REP.	MP	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
ANDROMED + DSI	I	2,4	39,14	40,64	50,88
	II	2,2	39,32	39,21	42,89
	III	2,2	40,74	42,52	36,22
	IV	2,6	38,32	36,50	37,54
Σ		9,40	157,52	158,87	167,53
\bar{X}		2,35	39,38	39,72	41,88
S		0,19	1,01	2,54	6,66
CV (%)		8,15	2,56	6,38	15,89

TRAT=Tratamiento; **REP**= Repetición; **MP**= Motilidad progresiva; **HOST** = Test de endosmosis; **ORT**= Test de resistencia osmótica; **AI**= Acrosomas intactos.

Los valores medios obtenidos en el protocolo de congelación de semen en el tratamiento B (Andromed® + Equex STM®) en las cuatro repeticiones generaron un motilidad progresiva de $2,35 \pm 0,19$; HOST de $39,38 \pm 1,01\%$; ORT $39,72 \pm 2,54\%$ y acrosomas intactos de $41,88 \pm 6,66\%$.

Los Coeficientes de Variación de las muestras de semen congelado en este tratamiento (CV) se ubican por debajo del 12% en lo que respecta motilidad progresiva (6,96%), HOST (11,66%), ORT (5,53%) lo que nos indican que existió una baja variabilidad entre las muestras de semen congelado para las variables mencionadas. Sin embargo el CV en los acrosomas intactos de 15,89% indica que hubo una mayor variabilidad en la selección de las pajuelas de semen congelado en este tratamiento sobre esta variable.

Anexo 11.3. Tratamiento C “Triladyl®”.

Anexo 11.3.1. Parámetros valorados de las muestras de semen congelado de los carneros en el tratamiento C (Triladyl®).

TRAT	REP.	MP	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
TRILADYL	I	2,8	45,74	47,60	36,83
	II	2,6	44,97	46,25	40,06
	III	3,6	45,43	44,87	37,78
	IV	2,6	48,08	45,29	46,19
Σ		11,60	184,21	184,00	160,86
\bar{X}		2,90	46,05	46,00	40,22
S		0,48	1,39	1,21	4,21
CV (%)		16,42	3,01	2,63	10,46

TRAT=Tratamiento; **REP**= Repetición; **MP**= Motilidad progresiva; **HOST** = Test de endosmosis; **ORT**= Test de resistencia osmótica; **AI**= Acrosomas intactos.

Los valores medios obtenidos en el protocolo de congelación de semen en el tratamiento C (Triladyl®) en las cuatro repeticiones generaron un motilidad progresiva de $2,9 \pm 0,48$; HOST de $46,05 \pm 1,39\%$; ORT $46,00 \pm 1,21\%$ y acrosomas intactos de $40,22 \pm 4,21\%$.

Los Coeficientes de Variación de las muestras de semen congelado en éste tratamiento (CV) se ubican por debajo del 12% en lo que respecta a HOST (3,01%), ORT (2,63%) y acrosomas intactos (10,46%) lo que nos indican que existió una baja variabilidad entre las muestras de semen congelado con respecto a estas variables. Sin embargo el CV en la motilidad progresiva (16,46%) indica que hubo una mayor variabilidad de las muestras de semen congelado para esta variable en este tratamiento.

Anexo 11.4. Tratamiento D “Triladyl + DSI”.

Anexo 11.4.1 Parámetros valorados de las muestras de semen congelado de los carneros en el tratamiento D (Triladyl® + DSI).

TRAT	REP.	MP	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
TRILADYL + DSI	I	3	52,92	52,79	48,99
	II	2,4	51,04	50,30	47,40
	III	3,4	52,80	48,54	49,00
	IV	3,6	50,21	50,76	48,52
Σ		12,40	206,97	202,39	193,91
\bar{X}		3,10	51,74	50,60	48,48
S		0,53	1,34	1,75	0,75
CV (%)		17,07	2,58	3,46	1,55

TRAT=Tratamiento; **REP**= Repetición; **MP**= Motilidad progresiva; **HOST** = Test de endosmosis; **ORT**= Test de resistencia osmótica; **AI**= Acrosomas intactos.

Los valores medios obtenidos en el protocolo de congelación de semen en el tratamiento D (Triladyl® + Equex STM®) en las cuatro repeticiones generaron un motilidad progresiva de $3,10 \pm 0,48$; HOST de $51,74 \pm 1,34\%$; ORT $50,60 \pm 1,75\%$ y acrosomas intactos de $48,48 \pm 0,75\%$.

Los Coeficientes de Variación de las muestras de semen congelado en éste tratamiento (CV) se ubican por debajo del 12% en lo que respecta a HOST (2,58%), ORT (3,46%) y acrosomas intactos (1,55%) lo que nos indican que existió una baja variabilidad entre las muestras de semen congelado con respecto a estas variables. Sin embargo el CV en la motilidad progresiva (17,07%) indica que hubo una mayor variabilidad de las muestras de semen congelado para esta variable en este tratamiento.

ANEXO N° 12.

Evaluación de las muestras de semen congelado por tratamiento y variable.

Los resultados de las muestras seminales congeladas en los tratamientos se detallan en el siguiente cuadro.

Anexo 12.1. Evaluación de los valores seminales medios obtenidos en el experimento por tratamiento para la congelación de semen.

Tratamiento	MP	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
A	2,75 \pm 0,19	43,83 \pm 5,11	44,97 \pm 2,50	46,35 \pm 5,44
B	2,35 \pm 0,19	39,38 \pm 1,01	39,72 \pm 2,54	41,88 \pm 6,66
C	2,90 \pm 0,48	46,05 \pm 1,39	46,00 \pm 1,20	40,22 \pm 4,21
D	3,10 \pm 0,53	51,74 \pm 1,34	50,60 \pm 1,75	48,50 \pm 0,75

MP= motilidad progresiva; **HOST**= porcentaje de endosmosis positiva; **ORT**= porcentaje de resistencia osmótica; **AI**= porcentaje de acrosomas intactos.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI; Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

El Anexo 12.1 muestra los valores medios más representativos de las características del semen congelado de los 16 eyaculados obtenidos en los tratamientos del experimento, se observa que la motilidad progresiva fluctúa entre 2,35 \pm 0,19 y 3,10 \pm 0,53; Host entre 39,38 \pm 1% y 51,74 \pm 1,3%; ORT entre 39,72 \pm 2,5% y 50,6 \pm 1,75%; y acrosomas intactos entre 40,22 \pm 4,2% y 48,5 \pm 0,75%.

ANEXO N° 13.

Análisis de los Coeficientes de Variación (CV) en el semen congelado por tratamiento y variable.

Anexo 13.1. Coeficientes de variación de la evaluación del semen congelado de los eyaculados en los cuatro tratamientos.

Tratamiento	MP (%)	HOST (%)	ORT (%)	AI (%)
A	6,96	11,66	5,53	11,74
B	8,15	2,56	6,38	15,89
C	16,42	3,01	2,63	10,46
D	17,07	2,58	3,46	1,55

MP= motilidad progresiva; **HOST**= Test de endosmosis positiva;

ORT= test de resistencia osmótica; **AI**= acrosomas intactos.

Tratamiento A.- Andromed ®; Tratamiento B.- Andromed ® + DSI;

Tratamiento C.- Triladyl®; Tratamiento D.- Triladyl® + DSI.

Los valores del coeficiente de variación mostrados en el Anexo 13.1 indican heterogeneidad de las muestras de semen congelado sobre la motilidad progresiva en los tratamientos C y D (Triladyl.- 16,42% y Triladyl + DSI.- 17,07%), y sobre la cantidad de acrosomas intactos en el tratamiento B (Andromed + DSI.- 15,89%). Los CV en las demás variables (HOST y ORT) por cada tratamiento indican que hay homogeneidad en las muestras concluyendo que existieron ciertas condiciones que no pudieron ser controladas satisfactoriamente en el experimento y que afectaron a las variables: “Motilidad progresiva” en los tratamientos C y D, y “Acrosomas intactos” en el tratamiento B, no sin antes recalcar que ninguna supera el 18% de variabilidad.

ANEXO N° 14.

Análisis del estimado de p en el semen congelado.

Anexo 14.1. Valores p obtenidos del análisis de varianza (ADEVA) de la evaluación del semen congelado por tratamiento y repetición.

Parámetro	Estimado de p	
	Tratamiento	Repetición
Motilidad progresiva	0,082	0,289
Host	0,001*	0,503
ORT	0,001*	0,840
Acrosomas intactos	0,104	0,326

* = Asterisco denota significación.

El análisis de varianza de los parámetros estudiados en la evaluación del semen congelado, denota que estadísticamente no existe diferencias entre los resultados obtenidos para las repeticiones ($p > 0,05$); sin embargo se establece diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los tratamientos en las variables: Integridad de la membrana plasmática (HOST.- $p = 0,001$) e integridad del acrosoma (ORT.- $p = 0,001$), no así en la motilidad progresiva (MP.- $p = 0,082$) y la tasa de acrosomas intactos (AI.- $p = 0,104$).

ANEXO N° 15.

Codificación de las pajuelas empleadas en la investigación.

TRATAMIENTO	CODIGO DE LA PAJUELA
Tratamiento A Andromed®	A1
	A2
	A3
	A4
Tratamiento B Andromed® + Surfactante.	AS1
	AS2
	AS3
	AS4
Tratamiento C Triladyl®	T1
	T2
	T3
	T4
Tratamiento D Triladyl® + Surfactante	TS1
	TS2
	TS3
	TS4

A, AS, T, TS.- Indican tratamientos.

1, 2, 3, 4.- Indican repeticiones.

ANEXO N° 16.
Materiales empleados.



Caja de espuma flex para congelación de semen, vasos de precipitación, tubos de ensayo, pipetas, porta y cubre objetos, tinciones (eosina, nigrosina), diluyentes seminales, pajuelas 0,5ml, microscopio óptico premier.

ANEXO N° 17.

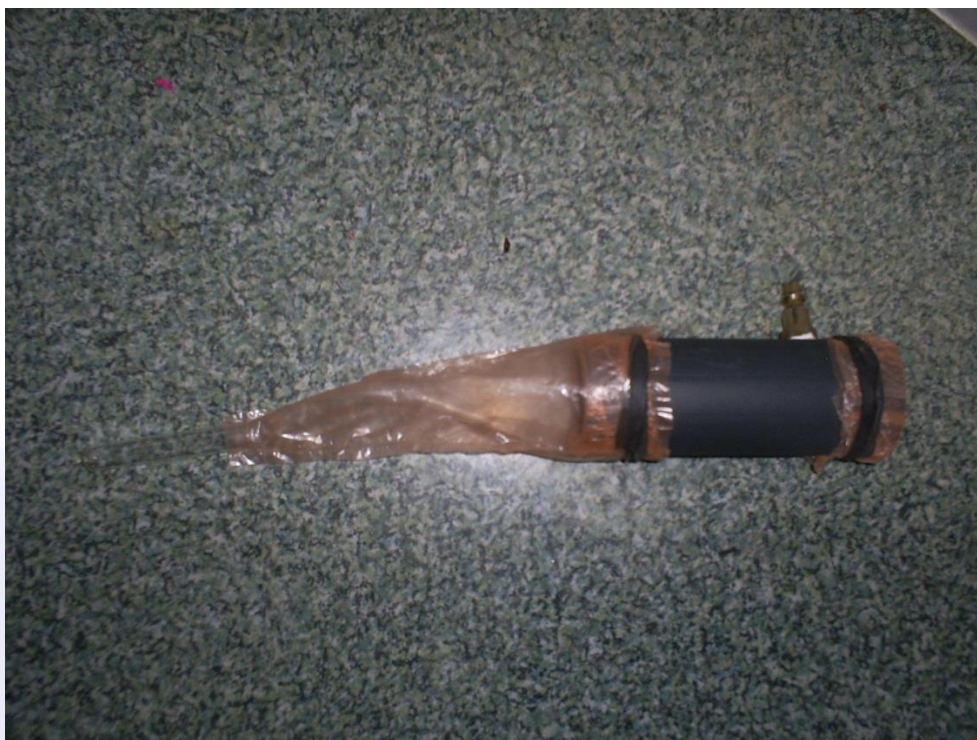
Diluyentes seminales y aditivo empleados.



Andromed®.- diluyente seminal a base de Tris y lecitina de soya. **Triladyl®**.- diluyente seminal a base de Tris y yema de huevo. **Equex STM®**.- detergente a base de Lauril sulfato de sodio (DSI).

ANEXO N° 18.

Vagina artificial y recolecta de semen



ANEXO N° 19.
Carneros empleados



ANEXO N° 20.
Carneros empleados



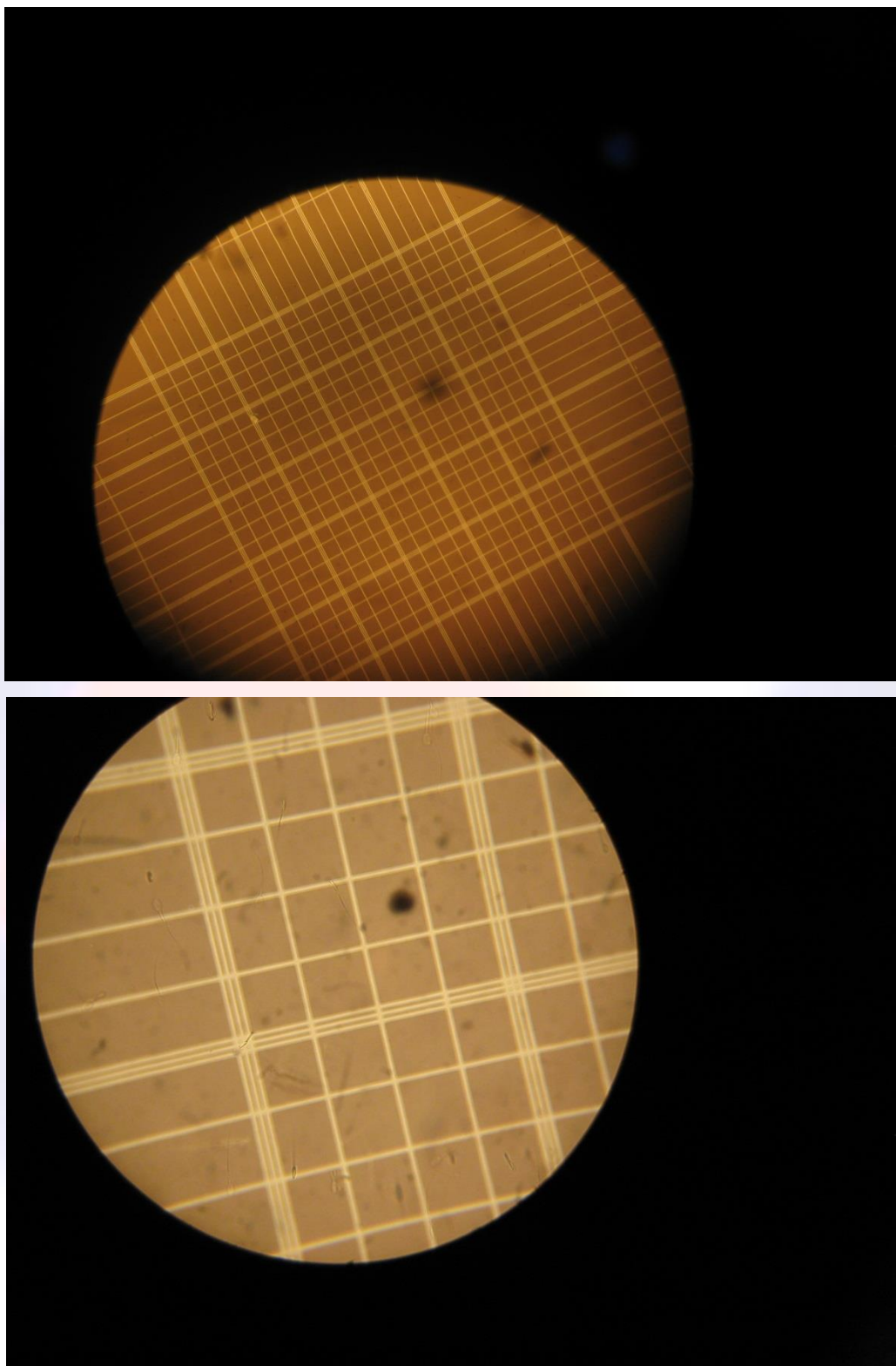
ANEXO N° 21.

Frotis seminal para viabilidad.

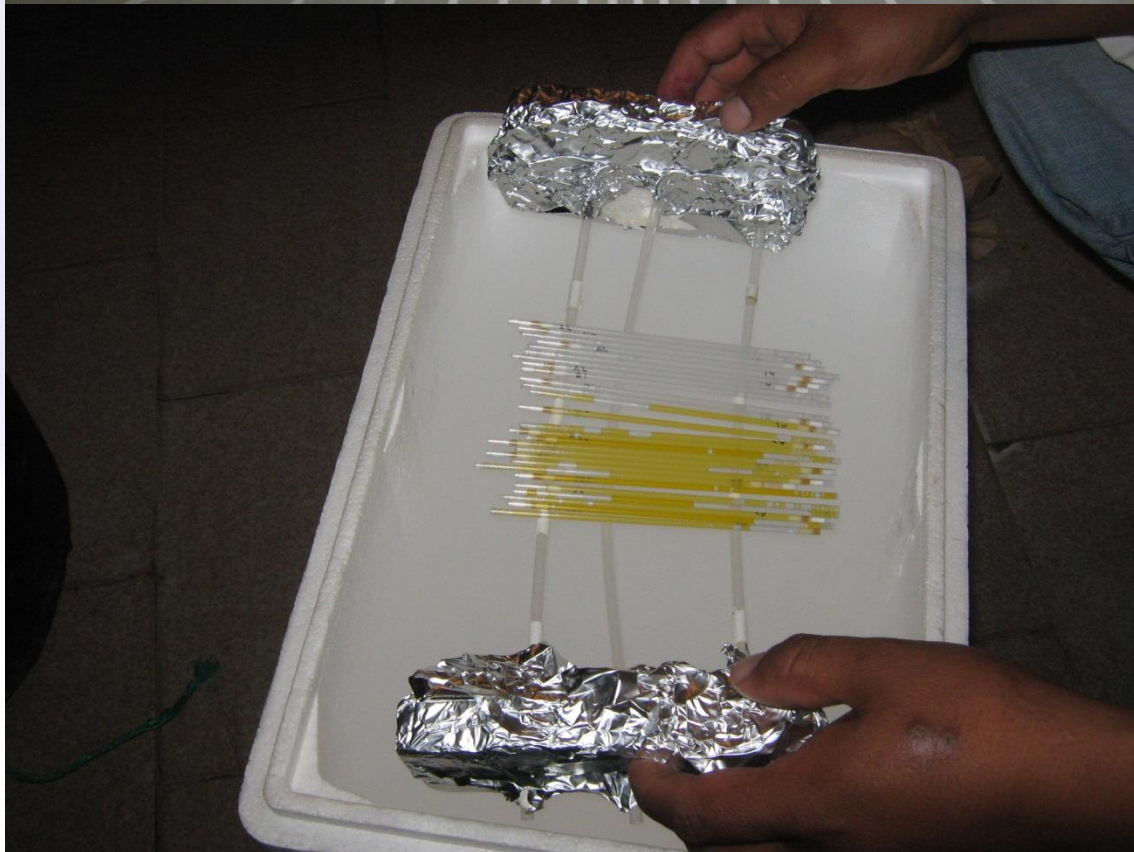
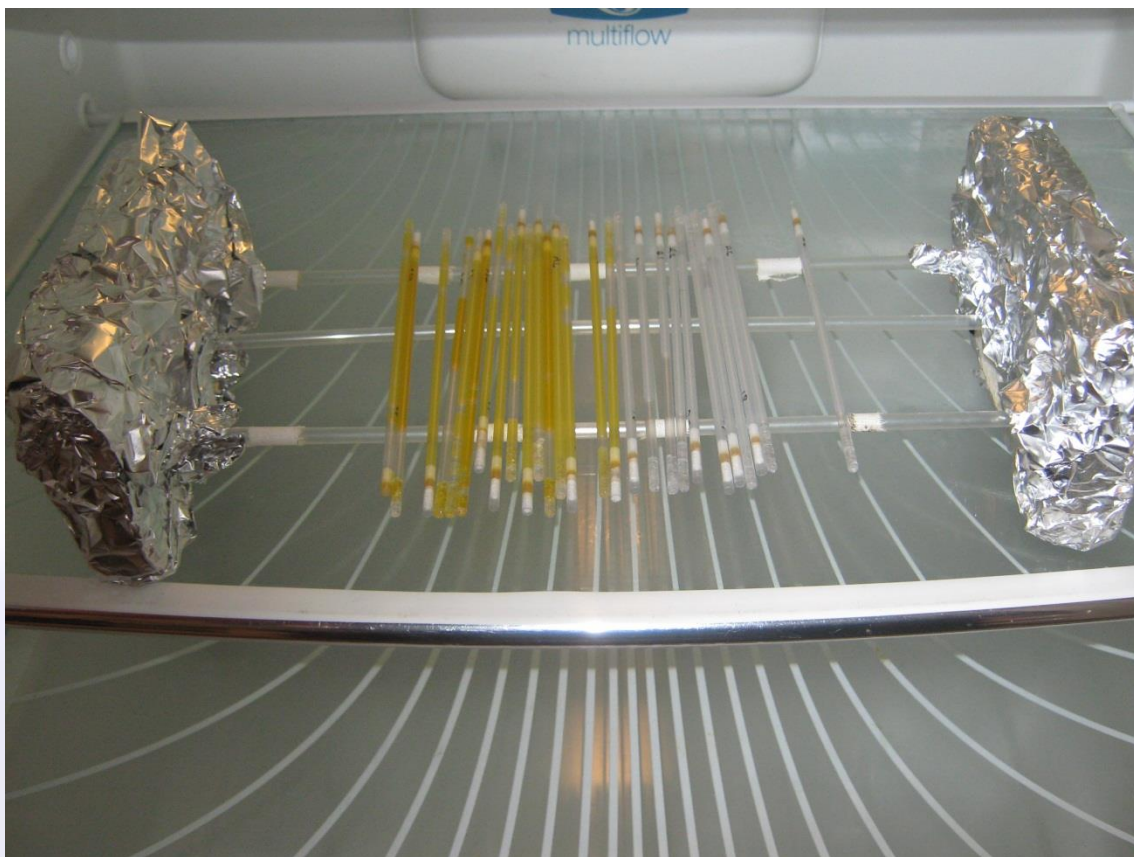


ANEXO N° 22.

Estimación de la concentración por cámara de Neubauer.



ANEXO N° 23.
Congelación de semen.



ANEXO N° 24.
Almacenamiento en nitrógeno líquido.



ANEXO N° 25.

Espermatozoides positivos al test HOST.

